



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Papel de los miARNs en el cáncer de mama en general
y en el estrógeno dependiente en particular.**

Role of miRNAs in breast cancer in general and in
estrogen dependent in particular.

Autora: Aida Baizán Martínez Alonso

Director: Carlos Manuel Martínez Campa

Santander, Junio 2020

Índice:

Objetivos y metodología de este trabajo	3
Resumen. Palabras clave.....	3
Abstract. Key words.....	4
1. Introducción	4
2. El cáncer de mama	7
3. Papel de los estrógenos en el cáncer de mama	8
4. Papel del estrógeno alfa en el cáncer de mama	9
5. Terapia endocrina basada en los estrógenos y sus receptores	10
6. Limitaciones de algunos medicamentos utilizados en el cáncer de mama.....	12
7. miARNs regulados por los estrógenos y su receptor.....	13
8. Los miARNs reprimidos por estradiol inhiben la proliferación celular estrógeno- dependiente	17
9. Regulación de la expresión de miARN por antiestrógenos en el cáncer de mama	18
10. miARNs relacionados con el cáncer de mama	20
11. Papel de los miARNs en las distintas etapas del cáncer de mama.....	21
• A. Proliferación celular y regulación del ciclo celular	21
• B. Invasión y metástasis	25
• C. Respuesta apoptótica y muerte celular.....	30
• D. Hipoxia y angiogénesis	34
12. Los microARNs como marcadores para la detección precoz.....	40
13. Potencial terapéutico de miARNs en el cáncer de mama	41
14. Conclusiones	43
15. Agradecimientos	44
16. Bibliografía	45

Objetivos y metodología de este trabajo:

El objetivo fundamental de este trabajo es establecer la relación entre los miARNs y el cáncer de mama, centrándome en el estrógeno dependiente.

Realizaré una revisión de la literatura publicada hasta hoy en día, con el objetivo de definir de forma genérica que son los miARNs, qué procesos biológicos regulan, haciendo especial hincapié en su papel en el cáncer de mama. Para ello utilizaré distintas bases de datos, artículos publicados en revistas científicas, así como libros y fuentes de soporte digital.

Para comenzar haré una introducción en la que explicaré qué son los miARNs, después me centraré en la relación que existe entre los miARNs y el cáncer en general. A continuación, hablaré sobre el cáncer de mama y el papel que desempeñan los miARNs especialmente en procesos como la apoptosis y la resistencia a tratamientos. Por último, trataré el tema de los tumores hormonodependientes (cáncer de mama estrógenodependiente) y también mencionaré terapias antiestrogénicas.

Resumen:

Los microARNs (miARNs) son moléculas cortas de ARN monocatenario, de entre 19 y 25 ribonucleótidos de longitud, que no codifican para proteínas y que han sido descubiertos en la década de los 90. Se generan mediante transcripción en el núcleo de la célula, siendo posteriormente modificados mediante su procesamiento y maduración en el citoplasma. Debido a su corta longitud, un solo miARN puede tener muchos ARNm diana y por lo tanto puede participar en la regulación de multitud de vías de señalización.

En los últimos años se ha determinado que los miARNs regulan multitud de procesos fisiológicos y que la pérdida de su función está asociada a numerosas patologías como el cáncer. En los últimos 4-5 años se está demostrando que mientras que algunas de estas moléculas son oncogénicas (oncomiRs), otras actúan como genes supresores de tumores (tsmiRs). En lo que se refiere al cáncer de mama, y más concretamente en el cáncer de mama hormonodependiente, los miARNs participan tanto regulando la síntesis de estrógenos como siendo, de manera recíproca, regulados por los mismos. Son capaces de interferir con la regulación transcripcional mediada por el receptor de estrógenos (RE α) y participan en las distintas etapas del desarrollo tumoral, tanto al inicio, como en la progresión, angiogénesis, metástasis, etc.

En esta revisión hemos hecho una recopilación de los hallazgos más relevantes publicados en la literatura científica en lo que se refiere al papel de los miARNs en el cáncer de mama y sus diferentes estadios, haciendo especial hincapié en el cáncer de mama hormonodependiente.

Palabras clave: cáncer de mama, miARNs, estrógeno alfa, apoptosis, metástasis.

Abstract:

MicroRNAs (miRNAs) are short single-stranded RNA molecules, between 19 and 25 ribonucleotides in length, that do not code for proteins and that have been discovered in the 1990s. They are generated by transcription in the cell nucleus, later being modified by processing and maturing in the cytoplasm. Due to its short length, a single miRNA can have many target mRNAs and therefore can participate in the regulation of many signaling pathways.

In recent years it has been determined that post miRNAs regulate a multitude of physiological processes and that the loss of their function is associated with numerous pathologies such as cancer. Over the past 4-5 years it has been shown that while some of these molecules are oncogenic (oncomiRs), others act as tumor suppressor genes (tsmiRs). With regard to breast cancer, specifically in hormone-dependent breast cancer, miRNAs participate both by regulating estrogen synthesis and by being reciprocally regulated by them. They are capable of interfering with transcriptional regulation mediated by the estrogen receptor (ER α) and participate in the different stages of tumor development, both at the beginning and in progression, angiogenesis, metastasis, etc.

In this review, we have compiled the most relevant findings published in the scientific literature regarding the role of miRNAs in breast cancer and its different stages, with special emphasis on hormone-dependent breast cancer.

Key words: breast cancer, miRNAs, alpha strogen, apoptosis, metastasis.

1. Introducción:

Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN monocatenario que presentan entre 19 y 25 nucleótidos de longitud. El primer miARN que recibió el nombre de lin-4, se descubrió en 1993 como un pequeño ARN transcrito a partir del locus lin-4 del gusano *Caenorhabditis elegans*. Hasta la fecha, según se recoge en la base de datos de secuencias de miARN miRBase (versión 22.0, marzo de 2018) (<http://www.mirbase.org/>), en el genoma humano se han descrito y caracterizado 2654 secuencias de miARN maduros hasta el momento.

El estudio de la función de todas estas secuencias ha permitido determinar que los miARN son reguladores postranscripcionales clave de la expresión génica en prácticamente todos los tejidos del organismo, así como en las diferentes etapas del desarrollo, actuando mediante interacciones altamente específicas y complejas redes reguladoras.

Los mecanismos de producción de miARN o biogénesis implican varios pasos biológicos cruciales a partir de la transcripción de miARN en el núcleo seguido de un posterior procesamiento y maduración en el citoplasma de la célula. Los genes miARN pueden ser intergénicos o intragénicos. Los genes miARN intergénicos son independientes, con sus propias unidades de transcripción que incluyen promotores, secuencias de transcripción y unidades de terminación. Sin embargo, los genes intragénicos se

encuentran en las regiones intrónicas o exónicas de los genes del genoma del organismo correspondiente, compartiendo las mismas unidades transcripcionales con estos genes que podemos denominar huésped. Los miARN intrónicos se encuentran en los intrones del ARN no codificante o en los genes codificadores de proteínas, mientras que los miARN exónicos comúnmente se superponen entre un exón y un intrón de un gen.

En los mamíferos, los genes de miARNs se transcriben mediante los complejos de la ARN polimerasa II y de la ARN polimerasa III para generar las unidades transcripcionales primarias (pri-miARN). Los Pri-miARNs típicamente comprenden varios miles de nucleótidos de longitud con estructuras locales denominadas de “bucle del tallo”, una tapa 5' y una cola poli-A. En la mayor parte de las ocasiones, la ARN polimerasa II es el tipo principal de polimerasa para la transcripción de miARN, aunque también existe un pequeño grupo de miARNs asociados con elementos Alu que se transcriben mediante la ARN polimerasa III. Como se muestra en la Figura 1, los pri-miARNs son procesados por un complejo de microprocesador, codificado por el gen 8 de la región crítica del síndrome de Drosha-DiGeorge (DGCR8), que genera las unidades transcripcionales precursoras (pre-miARNs), que tienen aproximadamente 70 nucleótidos de largo y que se disponen en forma de horquilla. Drosha es una endonucleasa de tipo RNasa III que escinde el pri-miARN, mientras que DGCR8 es una proteína de unión a ARN bicatenario que actúa como un ancla molecular que reconoce el pri-miARN y garantiza la correcta unión al procesador Drosha. Por lo tanto, este complejo responsable de la primera etapa en la generación de miARNs se denomina Drosha/DGCR8. [1]

Posteriormente, los pre-miARNs son transportados desde el núcleo al citoplasma por el complejo encargado del transporte nuclear dependiente de Ran-GTP: exportin 5 (XPO5). A continuación, ya en el citoplasma, el pre-miARN se somete a la escisión en asa por otra enzima ARN-asa III conocida como Dicer, con la ayuda de la proteína de unión a ARN de respuesta de transactivación (TRBP) para generar un dúplex miARN / miARN * maduro de aproximadamente 20 nt de longitud, como se muestra en la [Figura 1].

En el paso siguiente, los dúplex de miARN son reconocidos por un miembro de la subfamilia de proteínas Argonauta (Ago), incorporación que es facilitada por el complejo Dicer-TRBP y que da como resultado la formación del denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Los dúplex de miARN son separados o desenrollados a continuación en las dos cadenas individuales por helicasas de ARN. La cadena guía (cadena madura de miARN) permanece unida a RISC [1], mientras que la cadena molde, o de pasajero (miARN *) sufre degradación.

El miARN maduro unido a la proteína Ago se ensambla posteriormente en un complejo efector conocido como el complejo silenciador inducido por ARN que contiene miARN (miRISC). Siempre unido al miRISC, el miARN maduro reconoce y se une, mediante su secuencia complementaria o 'secuencia semilla' (nucleótido 2 a 8 desde miARN 5'-end), generalmente al 3'-UTR aunque en algunos casos, puede hacerlo al 5'-UTR o en la pauta abierta de lectura (ORF) del ARN mensajero diana (ARNm).

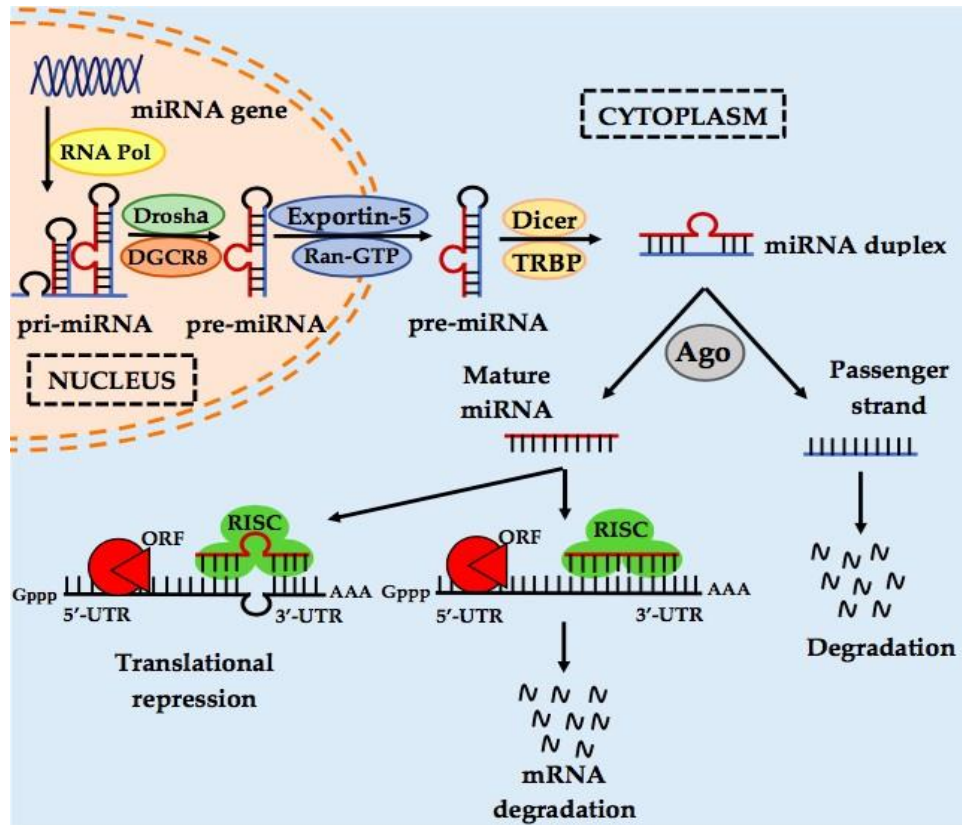


Figura 1: Biogénesis de microARN y modulación de la actividad de miARN. Los genes de miARN se transcriben para producir transcripciones de miARN primarias (pri-miARN) mediante la ARN polimerasa II. El complejo Drosha-DGCR8 escinde el premiar en una transcripción de minar precursora (pre-minar) que luego es transportada desde el núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares mediante exportan 5. En el citoplasma, el pre-miARN se modifica aún más por el DICER y complejo TRBP para formar un dúplex miARN maduro. El dúplex de minar se incorpora en un argonauta (ago.) con complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y el dúplex se desenrolla por heliaca en dos minar mono catenario. El minar mono catenario maduro puede unirse al Arna objetivo y ejercer su función inhibidora a través del bloqueo tradicional o degradación del Arna dependiendo del nivel de complementariedad de nucleótidos. Tomado de: Hui-Ya et al. *IJMS*, **2019**, 1-20. [PubMed].

El grado de complementariedad entre los miARNs y sus ARNm diana determina el mecanismo inhibidor de la traducción de las proteínas correspondientes, lo que resulta en definitiva en diferentes niveles de producción de las mismas. Mientras que el complemento perfecto entre los miARN y sus ARNm diana induce la degradación del ARNm, lo más frecuente es que se produzca un emparejamiento parcialmente complementario de bases entre los miARNsr y sus objetivos de ARNm, lo que resulta en represión o inhibición parcial de la traducción de proteínas.

Como cabe esperar desde el punto de vista probabilístico (debido a la corta longitud del sitio complementario miRNA-ARNm), un solo miARN puede unirse a múltiples ARNm y regular por lo tanto multitud de funciones en innumerables vías de señalización. Al mismo tiempo, un solo ARNm puede ser regulado de forma cooperativa mediante el reconocimiento por parte de varios miARNs diferentes (1). Se estima que aproximadamente un tercio de los genes que codifican proteínas podrían estar regulados por miARNs. Por lo tanto, la identificación de las dianas de cada uno de los miARNs es de gran importancia.

Debido a su diversa actividad, los miARNs pueden regular innumerables vías celulares y de señalización, incluido el desarrollo y la diferenciación celular, la proliferación celular y la apoptosis. Por lo tanto, la pérdida de la regulación de un solo miARN o un pequeño subconjunto de miARNs puede tener consecuencias dramáticas en lo que se refiere a la respuesta celular, desencadenando a veces procesos que resultan en el desarrollo de enfermedades, incluidas enfermedades cardiovasculares, enfermedades del desarrollo neurológico, trastornos autoinmunes, enfermedades óseas y cánceres humanos como el de mama.

2. El cáncer de mama:

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que plantea un gran desafío para la salud humana, reduce la calidad de vida y causa una carga financiera considerable en todo el mundo. Según el Global Cancer Project 2018 (GLOBOCAN 2018), el cáncer de mama femenino es en la actualidad el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado y la quinta causa principal de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. En este último año se han contabilizado 2.088.849 casos de cáncer de mama (11.6% de 18.1 millones de casos nuevos de cáncer) y 626.679 muertes relacionadas con cáncer de mama (6.6% de 9.6 millones de muertes) ocurrieron globalmente en el año 2018, mayoritariamente en mujeres, pero teniendo en cuenta que, aunque con baja incidencia, también se produce en hombres. Por lo tanto, la prevalencia y la letalidad del cáncer de mama resaltan la importancia de investigar los mecanismos involucrados en la tumorigénesis de la mama, así como el desarrollo de nuevos métodos para su pronóstico y la identificación de nuevos objetivos terapéuticos [2].

El cáncer de mama se inicia debido a la proliferación anormal de cualquier célula o tejido que recubre las glándulas y conductos mamarios. La mayoría de las lesiones malignas de la mama son carcinomas que pueden clasificarse específicamente como adenocarcinomas. El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea con gran diversidad intertumoral e intratumoral, y con una amplia variación entre los individuos afectados

Actualmente, el cáncer de mama se puede clasificar en seis subtipos intrínsecos moleculares: luminal A, luminal B, HER +, normal, basal (también conocido como triple negativo) y con niveles bajos de claudina. Cada uno de estos subtipos presenta características propias con su fenotipo, grado tumoral y caracterizaciones moleculares, incluidos los receptores hormonales para estrógenos y progesterona y el estado del receptor 2 similar a EGF humano (HER2) [3].

El cáncer de mama es una enfermedad neoplásica compleja, que como otros muchos tipos de tumores comprende los procesos de iniciación y crecimiento tumoral, metástasis e invasión y angiogénesis, con una posibilidad significativa adicional de recaída. Estos cambios hacia niveles superiores de malignización ocurren cuando las vías de señalización celular y molecular de las células mamarias están alteradas o presentan importantes cambios en su regulación

La tasa de supervivencia a cinco años del cáncer de mama en el estadio I es de prácticamente el 100%, mientras que para los estadios II, III y IV es del 93%, 72% y

26%, respectivamente. Aunque en las últimas décadas su diagnóstico preciso y la detección temprana han llevado a una disminución en las tasas de mortalidad, sigue siendo necesario el conocimiento de los mecanismos moleculares que tienen lugar en la malignización lo que permitirá lograr nuevos avances tanto en la prevención como en la detección y el tratamiento.

Una vez diagnosticado, las pacientes son sometidas a los tratamientos convencionales indicados en cada caso, como la cirugía, la radiación, la quimioterapia y la terapia hormonal, que inevitablemente tienen efectos secundarios, (fundamentalmente toxicidades y resistencia a los medicamentos empleados), a pesar de su innegable efectividad.

En los últimos años, los microARNs han comenzado a atraer un interés considerable en el campo oncológico ya que se ha comenzado a establecer su participación reguladora en el inicio, la progresión y la metástasis del cáncer de mama. Además, el nivel de expresión de ciertos miARNs está estrechamente relacionado con las características morfológicas, los perfiles inmunohistoquímicos, los parámetros histopatológicos, los resultados clínicos, el pronóstico y las respuestas a los diferentes tratamientos del cáncer de mama [4].

Muchos estudios recientes han demostrado la presencia de perfiles de expresión de miARNs aberrantes en el tejido mamario tumoral en comparación con el tejido mamario normal [4]. De esta manera, y como una de las clases más grandes de reguladores génicos, se está comenzando a vislumbrar que las moléculas de microARN tienen un gran potencial como nuevos agentes terapéuticos biológicos, objetivos o biomarcadores para el tratamiento del cáncer de mama.

3. Papel de los estrógenos en el cáncer de mama:

Debido a la escasa disponibilidad de prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama, la tasa de mortalidad está en un nivel alarmante a nivel mundial. En las mujeres, el cáncer de mama con receptor de estrógeno (RE +) positivo dependiente de hormonas representa aproximadamente el 75% de todos los cánceres de mama. Por lo tanto, desde hace décadas este hecho ha llamado la atención de los investigadores hacia la búsqueda y el desarrollo de medicamentos efectivos para el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas.

Como hemos indicado en el párrafo anterior, el estradiol, la hormona sexual femenina por antonomasia, tiene un papel vital en el inicio y la progresión de la neoplasia mamaria. Por lo tanto, el receptor de estrógenos (la proteína diana fundamental para ejecutar la señalización inducida por la presencia de estrógenos) es el objetivo central para el tratamiento de esta patología en el cáncer de mama positivo para receptor de estrógenos, u hormono-dependiente.

Con el aumento de la edad, el riesgo de sufrir cáncer de mama y las tasas de mortalidad debido a él generalmente aumentan. En las mujeres blancas no hispanas (NHW) y negras no hispanas (NHB), la frecuencia de ocurrencia y muerte por cáncer de mama es más alta que la de otros grupos raciales. Las diferencias globales en las tasas de cáncer de mama se ven afectadas por cambios en la prevalencia de factores de

riesgo y un diagnóstico deficiente. La adaptación del estilo de vida occidental y la demora en la maternidad ha aumentado el riesgo de cáncer de mama entre las mujeres asiáticas y asiático-americanas en las últimas décadas. En contraste, los países africanos muestran aproximadamente 8% de casos nuevos de cáncer de mama; La mayoría de las muertes ocurren debido al tratamiento limitado y al diagnóstico en etapa tardía. Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2015), las tasas de incidencia más altas de cáncer de mama se registraron en Malasia y Tailandia [5].

4. Papel del estrógeno alfa en el cáncer de mama:

Los estrógenos, y más concretamente el estradiol, son hormonas sexuales femeninas que presentan funciones fisiológicas llevadas a cabo principalmente por los subtipos de receptores de estrógeno RE α y RE β . El receptor alfa de estrógeno tiene un papel principal en el desarrollo del útero y la glándula mamaria, principalmente durante el desarrollo de las mismas en la pubertad y durante el embarazo. Por eso, una de las estrategias fundamentales en el tratamiento de esta patología se basa en el conocimiento de las reacciones que participan en la producción de estrógenos.

La enzima aromatasa sintetiza 17 β -estradiol a partir de androstenediona. Como ya se ha indicado, el estradiol (E2) se une al receptor de estrógenos situado en el citoplasma de las células epiteliales mamarias, y desencadena la dimerización del mismo. A continuación, es este complejo de E2-RE se transloca al núcleo donde reconoce y une al ADN en sitios de unión específicos ubicados en las regiones promotoras de algunos genes, conocidas como elementos de respuesta al estrógeno). La unión del complejo E2-RE va a reclutar al promotor a una serie de complejos multiproteicos que funcionan como coactivadores, y que fundamentalmente a través de dos regiones diferentes del receptor denominadas AF1 y AF2, van a desencadenar la actividad transcripcional mediada por el RE. De manera simplificada, la acción de los coactivadores se encamina a acetilar residuos de lisina en las colas de las histonas, de tal manera que se neutraliza la carga positiva de las mismas debilitando así la unión al ADN. Además, también se reclutan complejos remodeladores de cromatina, que desorganizan la estructura de la misma y facilitan el acceso de la polimerasa a estos promotores.

La pérdida de la regulación en el funcionamiento de estos diversos correguladores, la alteración de los niveles nucleares de los mismos y por último alteraciones que tengan como consecuencia alteraciones en la transcripción de los genes que los originan, puede conducir a una proliferación celular incontrolada que da como resultado cáncer de mama. Como ejemplo ilustrativo, la pérdida de la molécula de adhesión epitelial E-caderina conduce a la metástasis al interrumpir los contactos intercelulares. La producción demasiado elevada del corregulador MTA1 puede desencadenar una serie de mecanismos que alteran la función del receptor de estrógenos, lo que resulta en metástasis.

El producto del gen AIB1 (que actúa como corregulador del RE α) se amplifica en un cierto porcentaje de tumores mamarios, lo que da como resultado la activación de la metaloproteínasa 2 de matriz mediada por PEA3 (MMP2) y la expresión de MMP9 que causan progresión metastásica, debido a su papel degradando la matriz extracelular

facilitando así la diseminación de las células tumorales. Otro corregulador del receptor de estrógenos alfa es SRC-1, cuyos niveles altos llevan a la invasión y metástasis del cáncer de mama debido a que inducen la expresión de Twist (un factor de transcripción conocido por su participación en la transición epitelio-mesenquimal) mediada por PEA3.

En un estudio reciente, se ha demostrado que la sobreexpresión de PELP1 resulta en metástasis en aquellas pacientes RE α -positivas. Más en concreto, a nivel molecular se observó que la alteración de los niveles de los correguladores de RE α desencadenó una serie de alteraciones en la expresión de los genes involucrados en la metástasis [6]. El hecho de que estas alteraciones se produzcan solo cuando el RE α está implicado sugiere que los mecanismos moleculares implicados en la malignización y metástasis dependen específicamente de este subtipo de receptor.

Los antiestrógenos recientemente desarrollados no solo deben tener una buena afinidad de unión con un receptor particular, sino que también deben tener una activación selectiva para ese receptor que se expresa en la progresión del cáncer de mama. Por lo tanto, los antagonistas selectivos de RE α pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer de mama [7]. Tanto los inhibidores de la producción de estrógenos, como los antagonistas selectivos del ER α desarrollarán en el apartado siguiente.

5. Terapia endocrina basada en los estrógenos y sus receptores:

La terapia endocrina es el tratamiento de primera elección para la mayoría de las pacientes con cáncer de mama que son diagnosticados como positivos para el receptor de estrógenos. Actualmente, se aplican de manera habitual al menos dos clases de terapias endocrinas:

- Inhibidores de la aromatasa (IA): Los compuestos más comúnmente utilizados son el letrozol y el anastrozol disminuyen la producción de estrógenos al inhibir la enzima aromatasa, lo que suprime el nivel circulante de estrógenos [8]. Por el tipo de acción llevada a cabo por estos compuestos decimos que pertenecen al grupo de moduladores selectivos de los enzimas que sintetizan estrógenos (SEEM).
- Reguladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM): Dentro de esta categoría clasifican moléculas como el fulvestrano, que inhibe competitivamente la unión de estradiol a su sitio correspondiente en el receptor. Además, el fulvestrano presenta una afinidad mayor por el sitio de unión ubicado en el receptor de estrógenos alfa mayor que la del propio ligando endógeno. La unión del fulvestrano al RE ocasiona además un bloqueo de la dimerización del receptor lo que resulta en una inhibición del transporte del complejo RE-E2 del citoplasma de la célula epitelial mamaria al núcleo de la misma, lo que lógicamente impide que se desencadene la respuesta transcripcional mediada por los estrógenos [9]. Dentro de este grupo de moléculas que actúan como SERM hay algunas que actúan como antiestrógenos

a nivel de la mama, pero presentan el problema de actuar como agonistas parciales en otros tejidos, como sucede por ejemplo en el endometrio. Esto hace que su utilización durante tiempos largos pueda incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de útero. El tamoxifeno se une competitivamente con el receptor de estrógenos impidiendo al igual que en el caso del fulvestrano la unión del estradiol, y, por lo tanto, inhibe la función del estrógeno en las células mamarias. De esta manera, en presencia de tamoxifeno no se unen los coactivadores necesarios para que se produzca la transcripción, sino que a las regiones promotoras que contienen elementos de respuesta a estrógenos acudirán correpresores, que actúan inhibiendo la expresión de genes que aumentan la proliferación celular [8]. El modelo representativo de la acción bloqueadora de los antagonistas del receptor de estrógenos se ilustra en la [figura 2].

En la actualidad siguen desarrollándose compuestos que bloqueen específicamente la transcripción mediada por el RE α , como puede ser el 16 α -fluoroestradiol, la daidzeina o el kaempferol, moléculas cuyo potencial para ser utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama está siendo testada en la actualidad. Los antiestrógenos recientemente desarrollados no solo deben tener una buena afinidad de unión con un receptor particular, sino que también deben tener una acción selectiva sobre ese receptor que se sobreexpresa en la progresión del cáncer de mama. Por lo tanto, los antagonistas selectivos de RE α son útiles para el tratamiento del cáncer de mama, algunos ya están en unos y otros están en fase de ensayo.

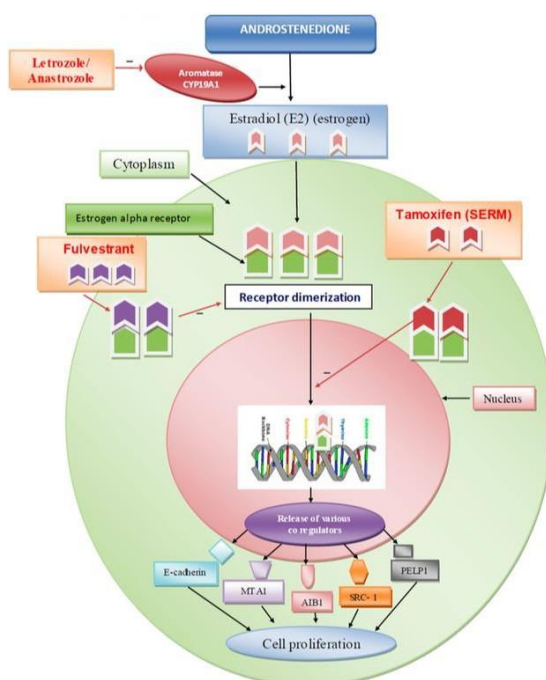


Figura 2: Mecanismo de acción de los antagonistas del receptor de estrógenos alfa y su papel como inhibidores de la proliferación en el cáncer de mama. Tomado de: Sharma y cols, **2018**.

6. Limitaciones de algunos medicamentos utilizados en el cáncer de mama:

Como ya hemos mencionado en el apartado anterior, en la actualidad se encuentran disponibles varias moléculas que de manera efectiva bloquean al receptor de estrógenos alfa y que por lo tanto son eficaces contra el cáncer de mama: tamoxifeno (i), raloxifeno (ii), toremifeno (iii) y fulvestrant (iv), pero todas ellas presentan en mayor o menor medida algunos inconvenientes. Algunas de las limitaciones son las siguientes:

- El tamoxifeno es el fármaco de elección más frecuentemente utilizado para el tratamiento de pacientes con tumores mamarios cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos. El problema principal de esta molécula es el desarrollo de la resistencia al mismo, que hace que en muchos casos se produzcan recidivas en las que el nuevo crecimiento tumoral ya no es bloqueado por esta molécula. La resistencia al tamoxifeno suele producirse al cabo de algunos años de tratamiento debido al cambio en su biocarácter de antagonista a agonista. Además, como también se mencionó con anterioridad, su faceta de agonista parcial le hace responsable de la génesis del cáncer de endometrio [10].
- El toremifeno es otra molécula que actúa como antagonista del receptor de estrógenos, pero puede ser agonista en otros tejidos. Su efecto tumoral puede estar relacionada directamente con el efecto sobre el receptor de estrógenos, pero también por su acción sobre la inducción de la apoptosis y el bloqueo de la expresión de determinados oncogenes. Las mujeres que toman toremifeno durante un período de tiempo prolongado para tratar el cáncer de mama, al igual que sucede en el caso del tamoxifeno, también tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de endometrio.
- El raloxifeno, un modulador selectivo oral del receptor de estrógenos, tiene la ventaja sobre las dos moléculas anteriormente mencionadas de que no parece ejercer un efecto proliferativo sobre el endometrio. Sin embargo, su principal desventaja radica en que aumenta la incidencia de coágulos sanguíneos, trombosis profunda y embolia pulmonar en las pacientes con cáncer de mama tratadas con este fármaco.
- El fulvestrano es un buen inhibidor del receptor de estrógenos alfa, pero presenta propiedades farmacocinéticas pobres, una de las más importante es su baja solubilidad en agua.

En conclusión, en la actualidad se están estudiando varias clases de antiestrógenos que se han diseñado y sintetizado buscando como premisa fundamental que presenten una unión selectiva para el receptor de estrógeno alfa. Dado que el receptor de estrógeno α es el principal responsable del inicio y la progresión del cáncer de mama, está claro que se siguen necesitando estrategias prometedoras para el diseño y la síntesis de nuevos ligandos terapéuticos que se unan selectivamente al mismo y que por lo tanto inhiban la actividad proliferativa dependiente del estrógeno.

Multitud de trabajos en los últimos años han puesto de manifiesto que los microARNs son moléculas que participan activamente regulando multitud de vías de señalización intracelular. En lo que se refiere al cáncer, pueden hacerlo tanto activando o inhibiendo la expresión de genes tan opuestos como pueden ser aquellos implicados en la supresión tumoral o aquellos conocidos por ser oncogenes. En lo que se refiere al cáncer de mama, y en concreto en el cáncer mamario hormono-dependiente, estos pequeños nucleótidos ejercen multitud de funciones a diferentes niveles, desde regular la síntesis de estrógenos como ser regulados, de manera recíproca por los mismos. También son capaces de estimular o inhibir la regulación transcripcional mediada por el receptor de estrógenos alfa, y de estimular o inhibir, según se trate de miRs oncogénicos o supresores de tumores, las distintas etapas del desarrollo tumoral, tanto en sus comienzos como en las distintas fases de proliferación, progresión, angiogénesis, diseminación, metástasis, etc. De esta manera se abren nuevas posibilidades en cuanto a la utilización de estas moléculas para el diagnóstico, pronóstico y terapia en el cáncer de mama [10]. Por lo tanto, a continuación, abordaremos la revisión del papel de los microARNs en las diferentes etapas, desde su interrelación con la síntesis de estrógenos hasta su efecto regulador en las fases más avanzadas de la enfermedad.

7. miARNs regulados por los estrógenos y su receptor:

Como ya hemos mencionado anteriormente, la expresión alterada de microARNs es común en el cáncer, incluyendo lógicamente el cáncer de mama. Comenzaremos por tanto con el análisis de la regulación de la expresión de los miARNs en respuesta a los estrógenos, que como hemos descrito anteriormente son hormonas esteroideas que participan en el desarrollo de la mama normal, pero también en la proliferación incontrolada y la progresión de los carcinomas de mama y que actúan mediante su unión a los receptores de estrógenos, de tal manera que el complejo formado tras la unión de la hormona con su receptor va a actuar como un factor de transcripción. De esta manera, se ha descrito como la expresión de numerosos miARNs, utilizando microarrays que permiten valorar simultáneamente los niveles de muchas moléculas, seguido mediante validación de los resultados obtenidos mediante experimentos de transcripción inversa-PCR (RT-PCR) en tiempo real, está alterada en varias líneas celulares de tumores de mama en las que la señalización de estrógenos ha sido inducida por 17 β -estradiol. Como cabía esperar, la expresión de un amplio conjunto de miARNs disminuye después del tratamiento con E2 de una manera dependiente del receptor de estrógenos. Además, la re-expresión inducida experimentalmente de varios de los miARN reprimidos reduce el crecimiento celular dependiente de estradiol, vinculando así la expresión de miARN específicos con la respuesta celular dependiente de estrógenos [11].

A continuación, se llevó a cabo un análisis de transcriptoma que reveló que los miR-26a y miR-181a reprimidos por E2 regulan muchos genes asociados con el crecimiento y la proliferación celular, incluido el gen del receptor de progesterona, un elemento clave en la señalización mediada por los estrógenos. Sorprendentemente, la expresión de algunos de estos miARNs también está regulada en los cánceres de mama de mujeres que recibieron terapia neoadyuvante antiestrogénica, lo que indica que esta estrategia terapéutica no es efectiva en el control de la transcripción de todos los genes implicados

en el cáncer. En general, las extensas alteraciones en la regulación de miRs en la vía de señalización de estrógenos indica que estas moléculas juegan un papel clave en las funciones celulares dependientes de los estrógenos y ponen de manifiesto la posible utilidad de valorar la expresión global de los miARNs en la comprensión de la resistencia a los antiestrógenos habitualmente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama [11].

La expresión diferencial de varios miARNs se correlaciona con los niveles y el estado de activación transcripcional de los receptores de estrógenos (ER α y ER β) [12], que como se ha indicado anteriormente son los dos miembros que unen hormonas estrogénicas, transformándose así en factores de transcripción que translocan y ejercen su función en el núcleo de la célula. Esto es particularmente interesante porque los datos experimentales, clínicos y epidemiológicos sugieren en gran medida que los Receptores de estrógenos, a través de su unión a la hormona esteroidea E₂, contribuyen al crecimiento de muchos cánceres de mama. En particular, el ER α se considera como uno de los objetivos fundamentales en las terapias endocrinas, ya que se expresa en una proporción que puede estimarse entre un 70% a un 75% de los cánceres de mama tempranos [12].

La unión de E₂ a los ER conduce a la regulación transcripcional de multitud de genes involucrados en el control del crecimiento celular. Los ER ejercen muchos de sus efectos al interactuar directamente o mediante la vinculación a otros factores de transcripción unidos a elementos de ADN ubicados en los promotores de genes diana [13]. Sin embargo, el conjunto de genes que median directamente los efectos de ER y todas las vías de señalización intracelular que pueden conducir a su expresión o inhibición de la misma distan mucho de estar totalmente identificados.

En los últimos años, muchos trabajos de investigación apuntan a la existencia de un nexo de unión entre las hormonas esteroideas, sus receptores y la regulación de los niveles de muchos microARNs. Una de las primeras evidencias, curiosamente, se obtuvo en líneas celulares humanas de endometrio (y no mamarias) donde se observó que el tratamiento con estradiol de células endometriales humanas, células epiteliales glandulares endometriales, miometrio o células de músculo liso de leiomioma conduce a una expresión alterada de algunos miARNs [14].

Muy poco tiempo después se identificaron ya en la línea celular MCF-7, derivada de adenocarcinoma mamario y con un crecimiento hormono-dependiente, dos miARNs que son regulados negativamente por el estradiol: miR-206 y miR-21 [15]. En este mismo sentido, la estimulación de varias líneas celulares de tumor de mama y de ovario con estradiol, puso de manifiesto que se producía una represión generalizada de la expresión de miARNs (como el miR-206 y el miR-21), represión que además era necesaria para el crecimiento celular *in vitro* dependiente de las hormonas esteroideas. También se demostró, que los miARNs más potentes en este efecto represor sobre el crecimiento celular, miR-26a y miR-181a, eran capaces a su vez de regular la expresión del gen que codifica el receptor de progesterona y muchos otros genes descritos previamente como asociados a la proliferación celular.

Una vez determinado que el estradiol modifica la expresión de numerosos miARNs, en este mismo trabajo se demostró que la expresión de varios miARNs también estaba regulada por el tratamiento antiestrogénico en los tumores de mama, lo que inmediatamente sugirió la posibilidad del uso potencial de estos pequeños nucleótidos como marcadores a utilizar para valorar la respuesta a los antiestrógenos. Como describiremos en los apartados posteriores, también se ha abierto una posibilidad muy interesante, la de que algunos microARNs podrían representar una nueva estrategia para abordar el problema de la inhibición selectiva de la transcripción mediada por los estrógenos.

Un par de años más tarde con respecto a los estudios anteriormente citados, otros grupos de investigación profundizaron en la identificación de miARNs regulados por estrógenos, nuevamente tomando la línea celular de cáncer de mama (ER α +) MCF-7. Utilizaron técnicas basadas en la utilización de una matriz sensible para el perfil de expresión de miARNs basado en sondas de captura modificadas con ácidos nucleicos bloqueados [16]. Esto les permitió aplicar un procedimiento directo de aislamiento de ARN, evitando así los pasos previos de selección de tamaño de ARN y/o la necesidad de amplificación de los mismos. En concordancia con los resultados descritos anteriormente, la consecuencia predominante del tratamiento con estradiol fue una represión generalizada de la expresión de miARNs. De hecho, identificaron que 23 miARNs (de los 125 miARNs cuya expresión es detectable en la matriz de acuerdo con sus criterios de inclusión), fueron significativamente inhibidos después del tratamiento con la hormona esteroidea. Por el contrario, en estos estudios no se identificaron inicialmente microARNs que presentaran una regulación al alza siguiendo los mismos criterios [17].

El paso siguiente consistió en validar los cambios de expresión detectados por el análisis de microarrays, mediante el análisis específico de ocho de los miARNs candidatos (miR-181a, miR-21, miR-181b, miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-27b, miR-23b) mediante técnicas de transcripción inversa seguida de PCRs a tiempo real. De esta manera se validó que la expresión de estos miARNs disminuyó en respuesta al tratamiento con tratamiento con E₂. Para excluir la posibilidad de que estos resultados fueran un artefacto producido de alguna manera como consecuencia de la manipulación experimental introducido en la recuperación de los miARNs, también se incluyó en el análisis la expresión de dos miARNs (miR-18a y miR-92) que no estaban regulados por E₂ según sus datos de microarrays. Esto sirvió como control de validación de los ocho candidatos anteriores, ya que, como se esperaba, miR-18a y miR-92 no cambiaron su expresión tras el tratamiento con E₂ [17].

Como el tratamiento con estradiol conduce a un aumento en la proliferación celular, y debido a que la expresión de muchos miARNs parece estar regulada por la densidad celular [18], se planteó además si los efectos observados podrían estar relacionados con la confluencia celular diferencial en las células tratadas con E₂ en comparación con las células tratadas con vehículo. No se observó ningún cambio en la expresión de miR-26a a diferentes confluencias, lo que demuestra que la diferencia en la expresión de miR-26a después del tratamiento con estradiol no está relacionada con el estado de confluencia [17].

Por último, se analizó mediante RT-PCR en tiempo real la expresión de los ocho miARNs regulados negativamente en respuesta a la hormona esteroidea en varias líneas celulares de cáncer mamario (T-47D, ZR-75-1, BT-474) u ovario (BG1), todas con crecimiento dependiente de estrógenos. De manera interesante, en todas estas líneas celulares, la expresión de los miARNs analizados estaba regulada negativamente por el tratamiento con E₂, es decir, la regulación dependiente de E₂ no está restringida a la línea celular MCF-7. Curiosamente, la represión dependiente de E₂ de la expresión de miRNAs probados no se observó en la línea celular de tumor de mama SK-BR-3 (ERα -), lo que sugiere que el receptor de estrógenos está involucrado en la regulación de miRNA dependiente de estradiol [17]. En el trabajo anteriormente comentado se demostró que varios miARNs disminuyeron su expresión de manera similar, sugiriendo una regulación a nivel transcripcional común y dependiente del receptor de estrógenos. Para comprobar esta dependencia, en el siguiente trabajo que vamos a describir a continuación se abordó la utilización de diversos antagonistas del receptor de estrógenos para comprobar si eran o no capaces de revertir la represión de los miARNs obtenida tras el tratamiento con estradiol. Efectivamente, se demostró que la preincubación de las células MCF-7 con ICI 182,780 (ICI), un antagonista puro de la acción genómica de ER, o con 4-hidroxitamoxifeno bloqueó la disminución dependiente de E₂ en la expresión de los miARN probados.

Los resultados presentados hasta ahora demostraron la influencia del estradiol inhibiendo la expresión de varios miARNs tras 48 horas de tratamiento. Se buscó entonces comprobar si la regulación podría tener lugar a tiempos más cortos. Los resultados obtenidos permitieron concluir que no había diferencias en la cantidad de los miARNs probados después de 6 horas de tratamiento con estradiol y que sólo tras 18 horas de tratamiento podía observarse un efecto débil pero reproducible. Esto muestra que los efectos reguladores del estradiol sobre los niveles de los miARNs son relativamente tardíos, en comparación con los resultados que la hormona produce sobre la transcripción de muchos genes, cuyos efectos pueden observarse después de 3 horas de tratamiento.

Es de destacar que la abundancia de miARN es el resultado de la transcripción del gen que contiene miARN como un pri-miARN, el procesamiento del pri-miARN transcrito en el miARN maduro, y la estabilidad del miARN. Por lo tanto, es posible que la regulación de la transcripción de los mirarnos ocurra en las fases más tempranas pero que el efecto sobre la abundancia de miARN ocurra en puntos de tiempo posteriores debido al procesamiento ineficiente del pri-miARN o una estabilidad importante del miARN maduro. Por lo tanto, se evaluó la regulación dependiente de estradiol de la expresión de ARNm primario. En concreto, se estudiaron los pri-miARNs que contienen los miARN más reprimidos (miR-21 y miR-181a y miR-181b), demostrándose que se producía una reducción de 3 a 4 veces en la expresión de estos pri-ARNm después de un tratamiento con E₂ de 3 horas. Esta temprana represión transcripcional dependiente de la hormona esteroidea se perdió parcialmente en presencia de ICI, lo que muestra la participación del receptor de estrógenos en este efecto. Esta represión también se perdió con el tratamiento con un inhibidor de la transcripción, la actinomicina D, lo que demuestra que el efecto está relacionado con la regulación transcripcional [17].

En la búsqueda del conocimiento de los mecanismos moleculares por los que el estradiol es capaz de influir en la expresión de los ARNm primarios eran objetivos primarios de señalización por parte del receptor de estrógenos (es decir, genes regulados en ausencia de síntesis de proteínas de novo), se examinó el efecto del cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas sobre la represión mediada por el estradiol. Se encontró de esta manera que el pretratamiento de las células MCF-7 con cicloheximida no cambió la represión transcripcional temprana mediada por E₂ de la síntesis de pri-miR-21 y pri-miR-181a~b-1. Sin embargo, la cicloheximida bloqueó la regulación dependiente de estradiol de pri-miR 17~92, una diana específica del factor de transcripción c-Myc cuya expresión es dependiente del estradiol. Estos resultados indican que pri-miRNA-21 y pri-miRNA-181a~b-1 son objetivos principales directos de la acción transcripcional mediada por el receptor de estrógenos [19].

Esta hipótesis se vio respaldada tras la identificación, mediante experimentos CHIP (inmunoprecipitación de cromatina) de sitios de unión para el ER α ubicados a <50 kb en las regiones promotoras del miR-21 o del miR-181a~b-1 [20].

8. Los miARNs reprimidos por estradiol inhiben la proliferación celular estrógeno-dependiente:

Debido a que el estrógeno funciona como un mitógeno en los tumores RE positivos, la regulación negativa observada de la expresión de los miARNs sugiere un posible papel para éstos en la proliferación de células cancerosas. Por lo tanto, se investigó si algunos miARN regulados negativamente por estradiol podían interferir con el crecimiento celular dependiente de estrógenos, analizando la actividad de proliferación de las células MCF-7 después de la reintroducción de cada uno de los miARNs previamente identificados. Las células MCF-7 se transfretaron con un miARN de control (miR-ctrl) o con cada uno de los ocho miARN candidatos y se trataron con estradiol. Los miR-181a y miR-26a inhibieron fuertemente el crecimiento celular dependiente de E₂, mientras que las células MCF-7 transfretadas con miR-ctrl continuaron creciendo durante todo el tiempo. miR-181b, miR-26b, miR-200c, miR-21 o miR-23b también inhibieron el crecimiento celular dependiente de E₂, pero en menor medida que miR-26a y miR-181a. Curiosamente, miR-26a y miR-26b, pero también miR-181a y miR-181b, difieren solamente tres nucleótidos en su secuencia, sugiriendo la especificidad del efecto. Por su parte, miR-27b no tuvo efecto sobre el crecimiento celular [21]. La re-introducción de miR-181a, miR-26a o miR-200c, pero no miR-ctrl o miR-27b, condujo a una fuerte disminución en la síntesis de ADN de las células tratadas con estradiol. Sin embargo, la re-introducción de miR-181b, miR-26b, miR-21 o miR-23b condujo a un efecto más leve en la reducción de la síntesis de ADN de las células MCF-7 tratadas con E₂. En conjunto, estos resultados muestran que entre los ocho miARNs regulados por E₂ probados, siete de ellos están funcionalmente involucrados, aunque en diversos grados, en el crecimiento celular dependiente de E₂.

Ya que miR-26 es uno de los miARN más potentes para inhibir la proliferación en su estudio, en otro trabajo se abordó el estudio de los cambios globales en el transcriptoma de las diversas células tratadas con estradiol en respuesta a la

transfección con este micro-ARN. Para ello, las células MCF-7 fueron cultivadas en presencia de estradiol y transfetadas o no con miR-26a. De esta manera, se encontró que hay 503 genes para los cuales la expresión está regulada (> 1.2 veces; $P < 0.05$) por miR-26a. Entre ellos, al menos 178 (35%) genes se engloban dentro del grupo de genes relacionados con el "crecimiento y la proliferación celular" según se determinó usando el software Ingenuity Pathways Way Analysis [21].

También se determinó que 343 de los genes identificados se encuadran dentro del grupo de genes cuya expresión es regulada en células MCF-7 tratadas con E2 en comparación con células tratadas con vehículo. La superposición entre ambas listas y la lista de genes regulados por miR-26a permite identificar un conjunto de 78 genes en común. De todos ellos, se determinó que sólo 5 genes (entre el conjunto de 78) contienen sitios de unión miR-26a predichos *in silico*.

Se centraron en el gen PGR (receptor de progesterona) por varias razones. Primero, las isoformas de PGR (-A y -B) son, como los ER, miembros de la familia de factores de transcripción de los receptores de hormonas esteroideas y son mediadores clave de la señalización de estrógenos. En segundo lugar, notaron que el promotor del gen PGR (3'UTR) es extremadamente largo (> 9 kpb) y que presentaba muy pocos sitios consenso de unión a miARNs predichos conservados (elementos de respuesta de miARN). Curiosamente, seis miARN (miR-26a, miR-26b, miR-181a, miR-181b, miR-23a, miR-23b), de los siete miARNs pronosticados *in silico* como de unión al receptor del gen PGR, pertenecían a su vez al grupo de miARNs reprimidos por E2. De ellos, dos miARNs (miR-26a y miR-181a) eran aquellos que inhibieron fuertemente el crecimiento celular.

Por lo tanto, se analizó la expresión de PGR en células MCF-7 cultivadas en presencia de E2 y transfetadas con miR-26a o miR-181a. Encontraron que ambos miARN inhibían la expresión de PGR en el ARN y el nivel de proteína. Por el contrario, los anti-miR contra miR-26a y miR-181a redujeron la expresión de PGR. Además, se demostró que los elementos de respuesta de miARN predichos efectivamente son críticos para la unión directa y específica de miR-26a o miR-181a al ARNm de PGR [21].

En general, este conjunto de resultados demuestra la participación de miARNs específicos en la supresión de la proliferación celular dependiente de E2 a través de su capacidad para regular genes involucrados en el control del crecimiento celular, como el que codifica las isoformas del receptor de progesterona.

9. Regulación de la expresión de miARN por antiestrógenos en el cáncer de mama:

La regulación de la expresión de miARNs por antiestrógenos en muestras de tumores de mama humanos se estudió en tumores de pacientes que participaron en un estudio piloto de fase II. Quince mujeres posmenopáusicas con tumores de mama ER positivos recibieron, como terapia neoadyuvante, una combinación de exemestano (un inhibidor de la aromatasa) y tamoxifeno durante 4 meses, diariamente antes de proceder con la cirugía. Como se esperaba, se observó que se producía una disminución en la expresión de marcadores biológicos implicados en las vías de

señalización dependiente de estrógenos (ER, PGR) y en los marcadores de proliferación (Ki-67 y ciclina D1) después del tratamiento.

A continuación, se aislaron los ARN a partir de la biopsia obtenida a partir del tumor de mama inicial y de la muestra obtenida en la cirugía en 10 de los pacientes que participaron en el estudio y se analizó la expresión de varios miARNs mediante RT-PCR en tiempo real. Se utilizó como control la expresión de miR-92, que no está regulada por E2, para comprobar que efectivamente no cambió con el tratamiento. La expresión de la mayoría de los miARN dependientes de estrógenos (miR-21, miR-181b, miR-26a, miR-26b, miR-27b, miR-23b) fue mayor después del tratamiento, lo que muestra la regulación de la expresión de miARN por tamoxifeno combinado con exemestano en cáncer de mama [11].

Como resumen de lo expuesto hasta ahora, podemos decir que algunos pri-miARN (como por ejemplo el pri-miR-21) son diana inmediata, y por tanto regulados por el receptor de estrógenos.

También hemos revisado múltiples líneas de evidencia experimental que apuntan a la participación de miARN específicos en la respuesta celular dependiente de E2. Hasta un total de 23 miARNs son regulados por estradiol en diversas líneas celulares humanas que expresan el RE α .

La expresión de la mayoría de estos miARN está regulada por los tratamientos anti-estrogénicos en los tumores de mama. Varios de ellos (los más eficaces identificados hasta ahora son miR-26a y miR-181a) contrarrestan el aumento dependiente de E2 en la proliferación celular, a través de una pérdida global en la regulación génica (entre los que destaca el gen que codifica para el receptor de progesterona) involucrados en el control del crecimiento celular.

Todo ello nos lleva a proponer a los miARN como una nueva clase de moléculas que modulan las funciones dependientes de E2.

En algunos casos, hay algunas discrepancias en la literatura. Mientras que en un trabajo se describe la inhibición dependiente de estradiol de miR-206 y miR-21 en las células MCF-7 [15], en otro artículo se apunta a que miR-206 no es regulado por la hormona esteroidea, probablemente en consonancia con la baja expresión de este miARN en esta línea celular [22]. También hay pequeñas diferencias con respecto al momento en el que se produce la represión, lo que puede deberse a condiciones celulares ligeramente diferentes (por ejemplo, tiempos de inanición sérica, confluencias celulares diferentes) (121). También se demostró recientemente que E2 indujo la expresión de varios miARN, incluido miR-21, en células MCF-7p, un derivado de células MCF-7 que contienen un vector bicistrónico, aunque esta discrepancia puede explicarse de manera sencilla al haber esta diferencia en la línea celular utilizada [23].

El mecanismo molecular por el cual el receptor de estrógenos regula la transcripción parece ser directo: en el promotor de la mayor parte de los miARNs reprimidos (como miR-21) se localizan varios elementos de respuesta a estrógenos [20,23]. Los antiestrógenos abolen la inhibición mediada por el estradiol (114). Además, los

ensayos de inmunoprecipitación de cromatina han confirmado la unión directa de ER α a la secuencia del promotor miR-21 [23].

Cabe destacar que la regulación negativa global de la expresión de miARNs es común en el cáncer y contribuye a la tumorigénesis. Esto parece tener lugar mediante la represión transcripcional generalizada o el procesamiento de miARN deteriorado por la pérdida de regulación de las células tumorales.

La pérdida de la regulación génica por los miARN también puede ocurrir mediante la regulación de la unión de miARN a los ARNm. Se ha demostrado recientemente que el cambio global de la expresión génica a isoformas 3'UTR más cortas, desprovistas de secuencias diana para miARNs específicos, es un mecanismo para controlar la proliferación durante la activación de los linfocitos [24]. Todos estos hallazgos sugieren que la regulación de la expresión génica por los miARNs generalmente tiende a suprimir la proliferación / transformación celular.

10. miARNs relacionados con el cáncer de mama:

Alrededor del 50% de los genes que codifican miARN humanos se encuentran en las regiones ligadas al cáncer o en los sitios cromosómicos frágiles [25]. Desde que se demostró en 2005 que la pérdida de regulación de los miARNs tiene un papel en el cáncer de mama [26], numerosos estudios han demostrado una expresión alterada de multitud de miARNs en este tipo de tumor. Estos miARNs asociados al cáncer de mama pueden subdividirse en los miARNs oncogénicos (oncomiRs) y los miARNs supresores de tumores (tsmiRs).

Los oncomiRs suelen estar regulados por presentar un aumento de expresión en las células tumorales mamarias, lo que conduce a la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores y por tanto pone en marcha mecanismos que llevan a neoplasia mamaria [27]. Por el contrario, los tsmiARNs pueden inhibir la expresión de oncogenes que a su vez promueven la tumorigénesis mamaria. Es fácil entender entonces que su regulación negativa puede conducir a malignidad mamaria. La [Figura 3] resume estas acciones reguladoras específicas de oncomiRs y tsmiRs en los eventos tumorigénicos.

Tanto los oncomiR como los tsmiR regulan críticamente el desarrollo y la progresión de los tumores de mama al participar en redes reguladoras complejas. Estas redes influyen en varias características distintivas del cáncer, como mantener el crecimiento y las señales proliferativas, la inmortalidad replicativa, iniciar metástasis e invasión, resistir a los mecanismos de respuesta apoptóticos y de muerte celular, inducir la angiogénesis, activar el metabolismo o la energía celular y apoyar el escape inmunitario celular [28].

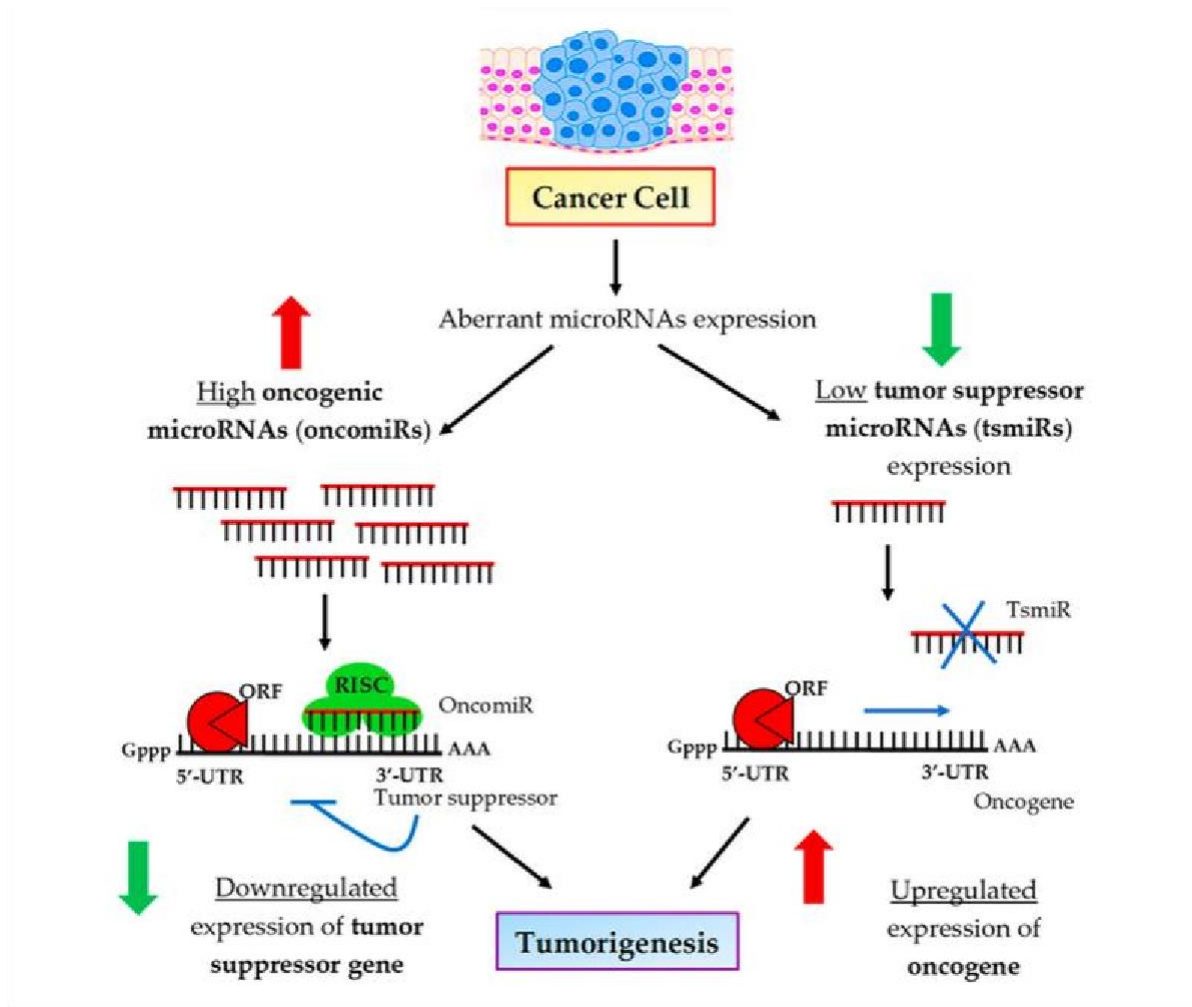


Figura 3: Mecanismos reguladores de los microARN oncogénicos y supresores de tumores en eventos tumorigénicos. Tomado de: Loh y cols. International Journal of Molecular Sciences. **2019**, 1-20.

11. Papel de los miARNs en las distintas etapas del cáncer de mama:

En los últimos años se ha producido un aumento exponencial de los artículos relacionados con el papel de los miARNs en el cáncer de mama en sus diferentes estadios. Por lo tanto, a continuación, discutiremos algunos de los hallazgos más relevantes en las diferentes fases de la carcinogénesis mamaria, siempre dando un protagonismo relevante a los tumores cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos.

A. Proliferación celular y regulación del ciclo celular:

El ciclo celular es esencial para mantener un delicado equilibrio entre la proliferación y supresión celular. Las células sanas tienen una limitada capacidad de división celular; tienen un número finito de divisiones celulares. Este comportamiento se debe a su respuesta a las influencias inhibitoras del crecimiento del medio ambiente. Sin embargo, este mecanismo de detención del ciclo celular fisiológicamente adaptativo es aberrante en las células cancerosas.

Los miARNs tienen un papel regulador fundamental en la proliferación celular y en las vías de señalización reguladoras de la progresión del ciclo celular en el cáncer de mama, mediante la interacción funcional con factores tales como las ciclinas, las proteínquinas dependientes de ciclina, inhibidores y otros factores promotores o supresores del crecimiento. Se ha descubierto como hay numerosos microARNs que tienen un papel inhibidor sobre la proliferación a través de la regulación del ciclo celular:

El primer gen a considerar es la ciclina E1 (un importante regulador del ciclo celular que participa en la transición entre las fases G1 – S), de la que se ha descubierto que es un objetivo importante para algunos miARN que funcionan como supresores de tumores. En concreto, los siguientes tsmiRs: miR-497, miR-16 y miR-30c-2-3p ven su expresión disminuida en los tumores mamarios. La sobreexpresión de estos miARN supresores de tumores fue capaz de inhibir la proliferación celular del cáncer de mama y la progresión del ciclo celular [29].

También se demostró en otro estudio que la ciclina E1 es un objetivo directo de miR-483-3p. La disminución de la expresión de ciclina E1 por la sobreexpresión de miR-483-3p impide aún más el inicio de la síntesis de ADN por p-NPAT (un activador de la transcripción). De este modo se bloquea a las células de cáncer de mama para que no entren en la fase S del ciclo celular. Además, la formación de un complejo entre la ciclina E1 y la quinasa dependiente de ciclina CDK2, responsable de la regulación del ciclo celular, también se ve obstaculizada por la sobreexpresión de miR-483-3p [29].

Otro miARN cuya sobreexpresión inhibe la proliferación celular es miR-143. Entre sus efectos está el inhibir la expresión de la quinasa regulada por señal extracelular ERK5, la proteína quinasa activada por mitógeno MAP3K7 y la ciclina D1, lo que redujo aún más la viabilidad de las células de cáncer de mama, mientras que la inhibición de miR-143 revirtió estos efectos [29].

La sobreexpresión de miR-455 también inhibe la proliferación celular del cáncer de mama mediante la regulación de la proteína quinasa CDK14 relacionada con Cdc2 y la expresión de ciclina D1. De manera importante, miR-455 también promovió la expresión del supresor tumoral p21 [30].

Otro microARN que inhibe la progresión a través del ciclo celular es miR-424. Se demostró que la expresión forzada de miR-424 (comúnmente inhibido en las células de cáncer de mama) permitió la inhibición de la proliferación celular y la regulación del ciclo celular al detener las células en la fase celular G2-M. miR-424 lleva a cabo esta función mediante su objetivo selectivo, la quinasa dependiente de ciclina CDK1. Además, la expresión de la proteína YAP asociada a Yes, (de la ruta hippo, implicada en la transición epitelio mesenquimal) y los niveles de p-ERK1 también disminuyeron con la sobreexpresión de miR-424 [30].

Con respecto a las MAP quinasas, se ha demostrado que miR-543 suprimió la proliferación celular del cáncer de mama, ralentizó la progresión a través del ciclo celular y promovió la apoptosis celular mediante la regulación directa de la vía ERK / MAPK [29].

Por el contrario, se ha descubierto como hay numerosos microARNs que tienen un papel estimulador de la proliferación a través de la regulación del ciclo celular, actuando por tanto como oncogenes. Algunos de los más relevantes son:

MicroARN-1207-5p. Se ha demostrado que, tras el tratamiento con estradiol, el nivel de expresión de c-MYC aumentó, lo que resultó en la activación transcripcional de un ARN largo no codificante, PVT1, en células de cáncer de mama. A su vez, los niveles elevados de PVT1 también indujeron significativamente la expresión de miR-1207-5p en muestras de cáncer de mama en comparación con los controles de células no tumorales. La expresión aumentada de miR-1207-5p promovió la proliferación celular y aumentó el porcentaje de células en la fase G2 del ciclo celular, mientras que la inhibición de miR-1207-5p suprimió la viabilidad celular y la progresión del ciclo celular. Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de miR-1207-5p regula negativamente la expresión de STAT2 (un activador de la transcripción) e inactiva a los inhibidores de la progresión en el ciclo celular CDKN1A y CDKN1B, lo que por tanto promueve la progresión del mismo [30].

El microARN miR-492 está notablemente sobreexpresado en el cáncer mamario. Se ha encontrado que su efecto principal es la represión del factor de transcripción SOX7 lo que resultó en un aumento de la proliferación celular y la progresión del ciclo celular. A su vez, SOX7 está estrechamente relacionado con la actividad de señalización de Wnt/ β -catenina, y la inducción de la ciclina D1 y c-MYC. Además, se demostró que el porcentaje de células en la fase G0/G1 del ciclo celular disminuyó en las células de cáncer de mama que sobreexpresan miR-492, mientras que el porcentaje de células en la fase S aumentó, lo que sugiere que miR-492 promueve la transición del ciclo celular entre las fases G1/S. [29].

Se ha descrito que miR-135b está regulado al alza tanto en muestras de cáncer de mama como en líneas celulares. La sobreexpresión adicional de miR-135b dio como resultado un aumento de la proliferación celular y la acumulación de células en fase S y en fase G2/M. También se ha demostrado que miR-135b podría promover el crecimiento celular e interrumpir el ciclo celular al regular negativamente una quinasa (LATS2) que actúa como supresora tumoral en las células de cáncer de mama. Además, las quinasas dependientes de ciclina CDK2 y p-YAP, también se regulan bajo el eje miR-135b/LATS2 [30].

La pérdida de regulación de los miARN con influencia en las vías reguladoras de la proliferación celular y del ciclo celular también parece desempeñar un papel fundamental en la resistencia a los tratamientos contra el cáncer de mama. Cabe recordar que muchos tratamientos tienen como objetivo suprimir el crecimiento y la proliferación celular [30].

El aumento de WBP2 (un coactivador transcripcional fundamental en la transactivación dependiente del receptor de ER α y del receptor de progesterona) está asociado con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama ER (+). El aumento de la expresión de WBP2 también facilita la transición de G1-S al regular muchas proteínas relacionadas con el ciclo celular, incluidas p21, CDK4 y ciclina D1. Se ha observado

como la sobreexpresión de miR-206 reduce los niveles de WBP2 lo que resultó en menor resistencia al tamoxifeno en las células del cáncer de mama [30].

En otro trabajo se ha descrito que la supresión de miR-15a/16 causó resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama al aumentar la tasa de proliferación celular y la progresión del ciclo celular, mientras que la expresión forzada de miR-15a/16 sensibilizó a las células al tratamiento con tamoxifeno inhibiendo negativamente la ciclina E1. También se demostró que el aumento de la expresión de E2F7, (que se correlaciona con una tasa de recaída más alta y un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama tratado con tamoxifeno), inhibía la transcripción del grupo miR-15a/16. Es decir, la sobreexpresión de E2F7 resultó en una disminución de la expresión de miR-15a/16, promovió la expresión de ciclina E1 e indujo el crecimiento celular a través de la resistencia al tamoxifeno [29].

miR-26a está regulado negativamente en tejidos de cáncer de mama hormono-dependiente lo que conlleva que el factor de transcripción E2F7 esté regulado positivamente. La sobreexpresión de miR-26a reprimió directamente la expresión de E2F7 a través de la inhibición traduccional e inhibió indirectamente la expresión de MYC en parte a través de la represión de E2F7. Recíprocamente, la sobreexpresión de E2F7 condujo a una disminución de la expresión de miR-26a a través de la inhibición transcripcional de miARN desencadenada por MYC. Cabe resaltar que la resistencia al tamoxifeno se revirtió con la sobreexpresión de miR-26a y el silenciamiento E2F7, lo que resultó en una reducción de la viabilidad celular del cáncer de mama y la detención del ciclo celular G1 [31].

El miR-26a no sólo parece proteger contra la resistencia al tamoxifeno. La sobreexpresión de miR-26a y miR-30b fue responsable de sensibilizar el cáncer de mama HER (+) al tratamiento con trastuzumab al inducir la detención del ciclo celular en la fase G1 y disminuir el número de células proliferativas (fases S y G2). Se demostró que la capacidad de miR-26a y miR-30b para inducir la sensibilización al tratamiento con trastuzumab se debe a su efecto directo sobre el silenciamiento de la ciclina E2 [30].

Los miR-365 y miR-22 también tienen una expresión disminuida en los tejidos de cáncer de mama en relación con los tejidos sanos no tumorales. Su re-expresión forzada inhibió el crecimiento de las células de cáncer de mama y las dotó de una mayor sensibilidad al fluorouracilo y al paclitaxel, respectivamente. Estos microARNs protegen contra la quimiorresistencia a través de GALNT4 y NRAS respectivamente. GALNT4 es responsable de la modificación de la proteína postranscripcional basada en la glucosilación, mientras que NRAS es un activador oncogénico de las vías asociadas a PI3K / Akt-, MAPK / ERK- y NF-κB quinasa; Por lo tanto, ambos son importantes para la proliferación celular y la progresión tumoral [29].

El tratamiento con glucocorticoides se usa frecuentemente como una medicación previa al tratamiento en la quimioterapia. Se ha demostrado que el tratamiento con dexametasona sintética (DEX) o con el compuesto natural imitador de glucocorticoides, la antcina A (ATA) aumentó notablemente la expresión de miR-708 en las células de cáncer de mama a través de la activación del receptor alfa de

glucocorticoides (GR α). Se observó una disminución en el porcentaje de células de cáncer de mama proliferativas y viables después del tratamiento con DEX, ATA o bien cuando fueron transfetadas con miR-708 lo que sugiere que los efectos inhibitorios de DXE y ATA en la tumorigénesis de mama tienen lugar a través del eje miR-708/GR α . Además, el tratamiento con DXE y ATA también resultó en la detención del ciclo en las transiciones G2/M y G1/S, respectivamente. Por último, este estudio también demostró que la activación de miR-708 por DXE y ATA fue capaz de interferir con la expresión de IKK β pero no la de IKK α ni IKK γ . La expresión de los genes asociados a NF- κ B: COX-2 y c-MYC también disminuyó tras la inducción de la expresión de miR-708 por tratamiento con los agonistas del receptor de glucocorticoides [30].

B. Invasión y metástasis:

Las células cancerosas van paulatinamente perdiendo las interacciones establecidas con la matriz extracelular, de tal manera que van volviéndose menos adhesivas a la matriz extracelular en comparación con las células no cancerosas, lo que les permite degradar la misma, escapar e invadir o hacer metástasis a través de la sangre o los sistemas linfáticos circundantes [32].

La transición epitelial mesenquimatosas (EMT) es una característica importante de la cascada de metástasis del cáncer de mama, que permite que las células cancerosas se reprogramen y adquieran características similares a las células madre y facilita sus capacidades migratorias e invasivas. Se sabe que la EMT implica la pérdida de la expresión de E-cadherina lo que reduce aún más la localización celular o el contacto célula-célula. [33] También hay estudios que indican que los niveles reducidos de E-cadherina en las células cancerosas podrían potenciar la vía de señalización de Wnt/ β -catenina [34]. La sobreexpresión de vimentina y el cambio de expresión de E-cadherina a N-cadherina también es un promotor de EMT que contribuye al fenotipo metastásico de las células cancerosas.

Al igual que en el apartado anterior, existe un creciente cuerpo de literatura que respalda el papel de los microARN para influir en el potencial metastásico e invasivo de las células de cáncer de mama a través de la regulación de la EMT y de la regulación de la expresión de genes responsables de la motilidad e invasión celular.

En primer lugar, se descubrió que la sobreexpresión del grupo miR-200c/141 mediaba el potencial metastásico de las células de cáncer de mama al regular positivamente la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno 2, también conocido como serpina B2. Cuando esto sucede, se produce una correlación con la expresión elevada de varios factores de transcripción, entre los que se encuentran c-Jun, c-Fos y FosB; además, se produce la translocación al núcleo de c-Jun y la inducción de la actividad de la, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en respuesta a la serpina B2. En paralelo, la expresión de miR-124a y miR-26b, estaba notablemente reducida en estas células de cáncer de mama [35].

En un modelo de ratón con xenoinjertos de tumores mamarios, se pudo comprobar que la sobreexpresión de miR-200c/141 indujo la aparición de un mayor número de metástasis en los pulmones y los ganglios linfáticos, mientras que la eliminación de la

serpina B2, utilizando siRNAs específicos, revirtió la metástasis inducida por miR-200c/141. En conclusión, la serpina B2 se asoció altamente con el riesgo de metástasis en el cáncer de mama y con un pronóstico más desfavorable. Por lo tanto, este estudio sugiere que la alta expresión del grupo miR-200c/141 y de la serpina B2 puede servir como un indicador pronóstico en el cáncer de mama triple negativo (TNBC) [35].

Otros estudios han corroborado estos resultados: Los miembros de la familia miR-200c/141 son inducidos por FOXP3 y KAT2B lo que resulta en invasión y metástasis. En un modelo de cáncer de mama en ratones heterocigóticos *Foxp3* *sf/+* se encontró que inicialmente los niveles de miR-200c/141 eran bajos en las células tumorales, pero se iba incrementando gradualmente durante la progresión tumoral y la metástasis en estos ratones. Ya en pacientes con cáncer de mama, se confirmó que los niveles plasmáticos de miR-200c/141 eran más altos en los cánceres de mama metastásicos en comparación con los tumores de mama localizados. Además, en estos pacientes, el aumento de los niveles de miR-200c/141 en plasma parece tener su origen en las células tumorales durante la progresión del cáncer, lo que sugiere un papel potencial para este grupo de miARNs como moléculas a considerar como biomarcadores de metástasis [36].

Los microARNs miR-200a y miR-210 se encuentran en niveles elevados en el plasma de pacientes con metástasis y que han desarrollado resistencia a la quimioterapia en comparación con pacientes quimiosensibles. La expresión de miR-200a se asoció estrechamente con la etapa de cáncer de mama, mientras que la expresión de miR-210 se produce sobre todo en el cáncer de mama avanzado en estadio IV. También se encontró que el aumento de la expresión de miR-210 se correlaciona con metástasis de órganos internos, sobre todo el hígado, pulmón y cerebro. La asociación entre miR-200 y miR-210 y la quimiorresistencia sugieren el potencial de estas moléculas como biomarcadores de resistencia a fármacos.

Otros estudios demostraron una sobreexpresión de miR-331 y una disminución de los niveles de miR-195 en pacientes con cáncer de mama metastásico en comparación con pacientes con cáncer de mama confinado localmente o controles sanos. Los estudios moleculares confirmaron que el papel tumorigénico de miR-331 se debe a su capacidad de alterar los niveles de varias dianas genéticas relacionadas con procesos metastásicos que incluyen HER2, HOTAIR (un ARN no codificante de cadena larga), E2F1 (un factor de transcripción que desencadena metástasis) y PHLPP (una proteína fosfatasa que actúa como supresor de tumores). Además, el papel de miR-195, un supresor tumoral conocido, también se ha validado mediante la confirmación de sus genes diana, FASN (ácidos grasos sintasa), HMGCR (2-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintasa) y CYP27B1 (1 α -hidroxilasa, activador de la vitamina D), factores que por su implicación en el metabolismo de la célula malignizada están implicados en el crecimiento tumoral, EMT, invasión y metástasis [37].

Otro miembro de la familia, el miR-200b, estimula la capacidad de invasión y migración de las células de cáncer de mama mediante la regulación de las proteínas Ezrina/Radixina/Moesin (ERM), de tal manera que una localización subcelular errónea de este complejo impide a las células establecer contactos célula-célula correctos. Así, el complejo ERM puede considerarse un biomarcador potencial durante el desarrollo

de tumores de mama. Estos datos sugieren que los mecanismos metastásicos subyacentes modulados por la sobreexpresión de los miembros miR-200 podrían ser diferentes según los diferentes miARNs considerados. Si bien existe un claro potencial para los miARNs de la familia miR-200 como biomarcadores para el cáncer de mama, se necesitan más datos para dilucidar completamente los mecanismos a través de los cuales estas moléculas contribuyen al proceso metastásico y cómo podrían usarse ventajosamente como biomarcadores u objetivos de tratamiento [38].

Otro microARN, el miR-122, es altamente secretado por las células de cáncer de mama hacia la circulación. Los altos niveles de miR-122 secretada se atribuyeron a la reprogramación del metabolismo de la glucosa en el nicho premetastásico. Se demostró que miR-122 suprime la captación de glucosa por las células no tumorales para satisfacer la necesidad metabólica de las células tumorales. Se demostró que este proceso facilita la metástasis *in vitro* e *in vivo*, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes en el nicho premetastásico. Se identificó que la disminución inducida por miR-122 en el consumo de glucosa en células no tumorales se producía a través de la inhibición de la piruvato quinasa (PKM) y la citrato sintasa (CS). La administración sistémica *in vivo* de anti-miR-122 mejoró la absorción de glucosa por órganos distantes, incluidos el cerebro y los pulmones, y disminuyó la tasa de metástasis [39].

La señalización de Wnt/ β -catenina se ha demostrado como uno de los reguladores importantes que controlan el mecanismo de EMT y metástasis de cáncer. La expresión de miR-374a está elevada en las células metastásicas de cáncer de mama y vinculada a un fenotipo pro-metastásico *in vitro*. Se observó una morfología celular similar a un huso o una estrella en cultivos de células de cáncer de mama enriquecidas con miR-374a. Además, la expresión aberrante de miR-374a se asoció con una regulación negativa sustancial de los marcadores epiteliales, incluida E-cadherina, γ -catenina y CK18, mientras que la expresión de marcadores mesenquimatosos, como vimentina y N-cadherina, se incrementó significativamente. Estos resultados sugirieron que miR-374a estaba asociado con características EMT en células de cáncer de mama. La expresión ectópica de miR-374a también aumentó la metástasis a distancia *in vivo*. Los estudios indicaron que miR-374a activó las cascadas de señalización de Wnt/ β -catenina ya que su sobreexpresión dio como resultado una translocación nuclear de β -catenina activada. Además, miR-374a suprimió directamente múltiples reguladores negativos de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, como los supresores de tumores WIF1, PTEN y WNT5A [40].

En contraste, se descubrió que miR-148a estaba regulado negativamente en células y tejidos de cáncer de mama, y su sobreexpresión inhibe la migración y la invasión de las mismas. WNT-1, que es uno de los ligandos en la señalización de Wnt/ β -catenina, se identificó como el objetivo de miR-148a. Además de la reducción de los niveles tanto del mensajero como de la proteína WNT-1, la sobreexpresión de miR-148a también disminuyó la expresión de los otros componentes críticos de la vía Wnt/ β -catenina, incluidas β -catenina, MMP-7 y TCF-4 [41].

De manera análoga a miR-148a, el miR-340 es otro miARN supresor de tumores que puede inhibir la migración, la invasión y la metástasis de las células de cáncer de mama al dirigirse a la cascada de señalización de Pnt./ β -catenina. Se identificó miR-340 como

un miARN regulador de la vía Wnt/ β -catenina con c-MYC y CTNNB1 (que codifica β -catenina) como dianas finales.

Estos dos últimos estudios demuestran que algunos miARN específicos funcionan como reguladores fundamentales en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y, por lo tanto, proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la metástasis del cáncer de mama [42].

La expresión de miR-34a se mostró inhibida en muestras de cáncer de mama con metástasis de ganglios linfáticos y en líneas celulares de cáncer de mama. En el caso de las muestras de pacientes, se encontró una disminución adicional de la expresión en etapas clínicas avanzadas. Se demostró que el nivel de expresión de miR-34a era inversamente proporcional a su objetivo directo TPD52, un oncogén bien reconocido en el cáncer de mama. La inhibición de TPD52 por la sobreexpresión de miR-34a en líneas celulares aumentó los niveles de expresión de E-cadherina al tiempo que disminuyó los niveles de TGF- β y N-cadherina. Además, se observó la represión de la transición EMT y una inhibición de la migración e invasión celular tras suprimir TPD52 por la expresión de miR-34a [43].

La disminución de miR-138 se asoció con metástasis e invasión de los ganglios linfáticos, mientras que su sobreexpresión condujo a la inhibición de la metástasis en las células de cáncer de mama [43]. Casi simultáneamente a este trabajo se publicó otro en el que se descubrió que la sobreexpresión de miR-138 estaba involucrada en eventos inhibitorios de la EMT a través de la inhibición de la expresión de vimentina, N-cadherina y Snail, en paralelo con un aumento de la expresión de E-cadherina, que actúa como un importante supresor de la transición epitelio mesenquimal y la metástasis [44].

El tejido del carcinoma ductal mamario infiltrante mostró una expresión significativamente débil de miR-494 en relación con la fuerte expresión positiva de miR-494 que se observó en el tejido mamario normal y sano. Además, la expresión elevada de miR-494 se asoció fuertemente con una mayor expresión del marcador epitelial, E-cadherina. También se mostró que la sobreexpresión de miR-494 suprimía la capacidad clonogénica y metastásica in vitro. Además, la expresión ectópica de miR-494 inhibió el inicio de la neoplasia, así como la metástasis pulmonar in vivo. La invasión del tejido adiposo peritoneal, el tejido muscular abdominal y la metástasis pulmonar también disminuyó ampliamente en ratones desnudos con sobreexpresión de miR-494 en comparación con los controles. Finalmente, se demostró que miR-494 inhibe PAK1 (quinasa activada por p21, con un papel promotor de la progresión tumoral). La sobreexpresión de PAK1 fue capaz de rescatar parcialmente la inhibición del potencial de invasión reprimido por miR-494 [45].

miR-33b se identificó como un regulador negativo de la troncalidad celular y la metástasis en el cáncer de mama. En las células tumorales mamarias, miR-33b está inhibido; su expresión se correlacionó negativamente con el estado de metástasis en los ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama. La sobreexpresión ectópica de miR-33b en células de cáncer de mama altamente metastásico inhibió la adquisición de propiedades similares a las células madre, la migración y la invasión in

vitro, y suprimió la metástasis pulmonar in vivo. Por el contrario, la pérdida de miR-33b resultó en los efectos opuestos. Se demostró que las acciones de miR-33b como supresor de tumores tienen lugar a través de la regulación negativa de sus objetivos HMGA2 (altera la estructura de la cromatina y provoca la transcripción de multitud de genes), SALL4 y Twist1 (dos factores de desarrollo embrionario, silenciados en los tejidos sanos adultos y reexpresados en el cáncer de mama) [46].

Además, hay muchos otros miARNs que parecen estar involucrados en la supresión de metástasis e invasión de cáncer de mama in vitro e in vivo; estos incluyen los miARNs miR-497, miR-421, miR-193a, miR-211-5p, miR-335, miR-133a y miR-124, que se proponen para suprimir la expresión de SMAD7, MTA1, WT1, SETBP1, EphA4, LASP1 y STAT3, factores que todos ellos tienen en común haber sido identificados por su participación en la diseminación de las células cancerosas, a través de la inducción desregulada de multitud de vías de señalización. Se encontró por tanto (como era de esperar) que estos miARNs estaban regulados negativamente en los tumores mamarios. En experimentos de sobreexpresión, se demostró que la reintroducción de alguno de las dianas de estos miARNs revirtió los efectos inhibitorios sobre la migración e invasión celular [47].

Los miARNs miR-497 (identificado en el trabajo anteriormente comentado por su propiedad de inhibir SMAD7) y miR-195, son capaces de unir y bloquear al promotor del grupo de diferenciación CD274 (también conocido como PD-L1, proteína que media la supresión del sistema inmunitario) en TNBC células, lo que sugiere el potencial de miR-497/195 para estimular la respuesta inmune y el escape inmune del tumor [48]. En un estudio relacionado, se demostró que existe una correlación significativa entre la expresión de CD274 y las metástasis de cáncer de mama [49].

La sobreexpresión de miR-204-5p resultó en una reducción significativa en la proliferación y migración celular in vitro, inhibición del crecimiento tumoral y desarrollo de eventos metastásicos in vivo. Este microARN es un potente inhibidor de la vía de señalización de PI3K/Akt al inactivar directamente PIK3CB (subunidad catalítica de la PI3 quinasa). Se demostró que la sobreexpresión de miR-204-5p mejora la sensibilidad hacia los inhibidores de PIK3CB y otros fármacos quimioterapéuticos como doxorubicina, taxanos y bortezomib. La sobreexpresión de miR-204-5p también mejoró la reprogramación del microambiente inmune del tumor mediante la regulación de genes clave relacionados con las vías inmunes, incluidas la señalización de TNF y citoquinas. Otros efectos importantes encontrados fueron el aumento del número de células T CD4 +, células T CD8 + y células T reguladoras [50].

Es importante que las investigaciones futuras se centren en identificar las vías reguladoras de reprogramación inmune que median la relación entre estos miARNs y sus genes diana, candidatos para desarrollar futuras estrategias pronósticas y terapéuticas para el tratamiento antimetastásico del cáncer de mama.

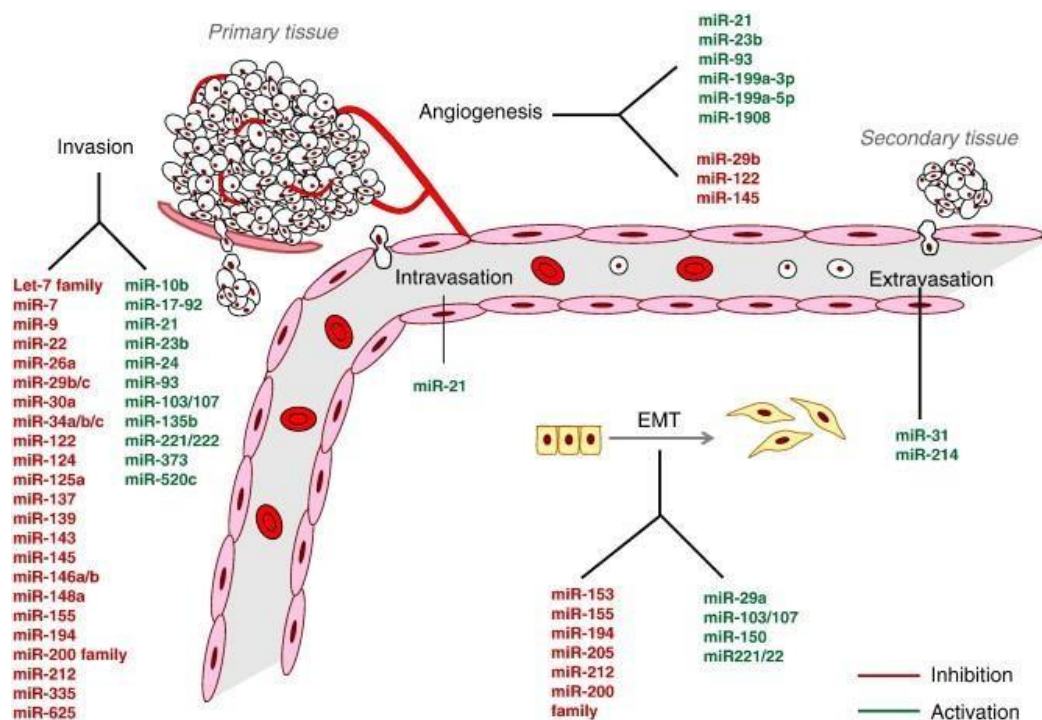


Figura 4: miARNs con participación en los procesos de invasión, angiogénesis, extravasación y transición epitelio-mesénquima. Tomada de Bouyssou y cols, *Biochimica et biophysica acta (BBA)- Reviews on cancer*. **2014**, 255-265.

C. Respuesta apoptótica y muerte celular:

La interrupción del contenido cromosómico o genético de una célula normal puede conducir a la activación de una serie de vías de señalización de muerte celular programada, proceso conocido como apoptosis, lo que sirve como mecanismo de defensa. Las células cancerosas van adquiriendo resistencia a la respuesta apoptótica a pesar de que su contenido genético se ve profundamente afectado. La interrupción en cualquier punto dado de las vías de apoptosis puede desencadenar la transformación maligna en las células mamarias, permitiendo así la viabilidad celular. Está demostrado que las células de cáncer de mama pueden evadir la respuesta apoptótica a través de una serie de mecanismos, incluida la pérdida del supresor tumoral p53, la pérdida de regulación de la actividad de varias de las caspasas, la regulación al alza de algunos reguladores pro-supervivencia, la regulación a la baja de los factores pro-apoptóticos y la inhibición, en definitiva, de la muerte celular programada.

Al igual que en los procesos de proliferación, invasión y metástasis, multitud de investigaciones recientes han demostrado que los miARNs también desempeñan un papel importante en los complejos mecanismos reguladores apoptóticos en el cáncer

de mama tanto inhibiendo como activando componentes involucrados en múltiples vías de muerte celular [51].

Se ha descrito que el aumento de la expresión de miR-519a-3p en células de cáncer de mama permite la protección contra la apoptosis inducida por TRAIL y el ligando de Fas, al disminuir la expresión de sus genes diana que codifican TRAIL-R2 (TNFRSF10B) y la caspasa-8 y por último, su objetivo indirecto: la caspasa-7. El miR-519a-3p también comprometió la funcionalidad antitumoral de las células asesinas naturales (NK) al reducir la apoptosis inducida por granzima B y regular negativamente la expresión de una serie de ligandos clave (NKG2D, MICA y ULBP2) para el receptor de activación de los linfocitos natural killer (NK). De esta manera, las células cancerosas evitan la destrucción inmune mediada por células NK al disminuir el reconocimiento de MICA y ULBP2 en la superficie celular de estos linfocitos. Se demostró además que miR-519a-3p se expresa altamente en el cáncer de mama de grado avanzado con p53 mutado y se asocia con un mal pronóstico y baja tasa de supervivencia de los pacientes [51].

El supresor tumoral pro-apoptótico p53 reduce los niveles (mediante inhibición a nivel transcripcional) de miR-191-5p mediante la unión al elemento de respuesta a p53 presente en su región promotora. En las células de cáncer de mama, la sobreexpresión de miR-191-5p resultó en un menor número de cuerpos apoptóticos y una disminución en la actividad de las caspasas 3 y 7, mientras que anti-miR-191-5p revirtió este efecto. Además, el mayor nivel de miR-191-5p fue capaz de regular negativamente su potencial objetivo SOX4, lo que redujo aún más la expresión de p53 en las células de cáncer de mama, lo que indica la existencia de un circuito de retroalimentación reguladora p53-miR-191-SOX4. Por último, se descubrió que el tratamiento anti-miR-191-5p sensibilizaba a las células de cáncer de mama hacia la apoptosis inducida por el fármaco doxorrubicina al aumentar los niveles de p53, lo que sugiere el potencial clínico de las terapias contra el cáncer de mama dirigidas a este miARN [52].

Otro microARN, el miR-204, se comporta como un supresor de tumores al promover la apoptosis en las células de cáncer de mama al inhibir JAK2 (estimulador de la proliferación). Además, el nivel de expresión de miR-204 se correlacionó negativamente con p-STAT3 y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y survivina en el cáncer de mama [52].

El miR-148a también promueve la apoptosis y está regulado negativamente en líneas celulares y tejidos de cáncer de mama. La sobreexpresión de miR-148a redujo la viabilidad y la quimiorresistencia de las células tumorales mamarias y aumentó la tasa de apoptosis. Además, el aumento de la expresión de miR-148a también inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*. Entre sus dianas más importantes está la proteína antiapoptótica Bcl-2, cuyos niveles correlacionan inversamente con los de este microARN. Esto sugiere que miR-148a puede servir como un supresor tumoral con un potencial terapéutico en el cáncer de mama por su papel silenciador del factor inductor de la supervivencia Bcl-2 [53].

El miR-101 está regulado negativamente en células y tejidos de cáncer de mama. En experimentos de transfección, este microARN es capaz de desencadenar un marcado aumento de la apoptosis. También se observó una disminución en la expresión de

EYA1 (una fosfatasa que promueve proliferación, migración e invasión) después de la sobreexpresión con miR-101, mientras que la transfección con el inhibidor de miR-101 dio el resultado opuesto. Además, la expresión de los componentes de las vías de señalización de Notch (un conocido oncogén), disminuyeron significativamente cuando aumentan los niveles de miR-101 o cuando se inhibe EYA1 mediante el uso de siARNs. Juntos, estos hallazgos sugieren que miR-101 promueve la apoptosis al regular negativamente a EYA1 mediante las vías de señalización de Notch. Otro trabajo relacionado sugiere que la sobreexpresión de miR-101 induce apoptosis en el cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* inhibiendo SOX2, lo que resultó en la inhibición del crecimiento, la proliferación y la migración del cáncer de mama [53].

Otro grupo de investigadores descubrió que la calistatina es una proteína capaz de reducir la viabilidad y aumentar la muerte celular apoptótica y la actividad de la caspasa-3 en las células de cáncer de mama. También se encontró que la calistatina induce la autofagia en las células de cáncer de mama al aumentar la expresión de una serie de marcadores de autofagia como LC3B, Atg5 y beclin-1. Esto parece hacerlo mediante su unión a heparina, lo que inhibe la proliferación de células cancerosas inducidas por Wnt3a aumentando la expresión de PPAR γ en las células tumorales mamarias [54].

La calistatina es capaz de inhibir la expresión de miR-21 (microARN oncogénico) lo que a su vez redujo la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico) y aumentó la síntesis de BAX (proapoptótico). Además, la calistatina reduce la expresión dependiente de malignización de miR-203 lo que lleva a una mayor expresión del supresor tumoral SOCS3. Por el contrario, la calistatina estimula la expresión de los supresores tumorigénicos miR-34a y p53. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la calistatina tiene efectos potenciadores de la muerte celular por autofagia y apoptosis en el cáncer de mama al suprimir los niveles de expresión de miR-21 y miR-203, y al estimular la síntesis de miR-34a [54].

En los mamíferos, el telómero consiste en repeticiones en tándem TTAGGG que se localizan al final de cada cromosoma y que sirven para proteger al mismo contra el daño del ADN y evitar el contacto con los cromosomas vecinos. La longitud de los telómeros se acorta progresivamente durante la sucesión de divisiones celulares que se van produciendo en las células somáticas humanas, lo que finalmente conduce a la pérdida de la funcionalidad de los telómeros, la inestabilidad cromosómica y el inicio de la senescencia celular, la apoptosis y el envejecimiento humano. Las células cancerosas desarrollan inmortalidad debido a su actividad única de telomerasa. La telomerasa es un complejo enzimático de ribonucleoproteína que mantiene y repone las repeticiones de ADN telomérico en el extremo cromosómico, uno de los principales mecanismos de promoción de tumores en el cáncer [55]. La proteína de la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT) y el molde de ARN de la telomerasa (hTERC) son reguladores esenciales de la actividad de la telomerasa [55].

Se demostró que la expresión de miR-296-5p y miR-512-5p estaba regulada negativamente en las células tumorales mamarias. La baja expresión de miR-296-5p/512-5p y la alta expresión de hTERT se asocian con malos resultados clínicos en pacientes con cáncer de mama de tipo basal. La expresión ectópica de miR-296-

5p/512-5p se asoció a una menor actividad de la telomerasa, un mantenimiento más débil de los telómeros y la activación de programas de senescencia y apoptosis replicativos en este tipo de cáncer mamario, mientras que el silenciamiento epigenético de miR-296-5p/512-5p activó hTERT e indujo la protección de la apoptosis en las células de cáncer de mama [56].

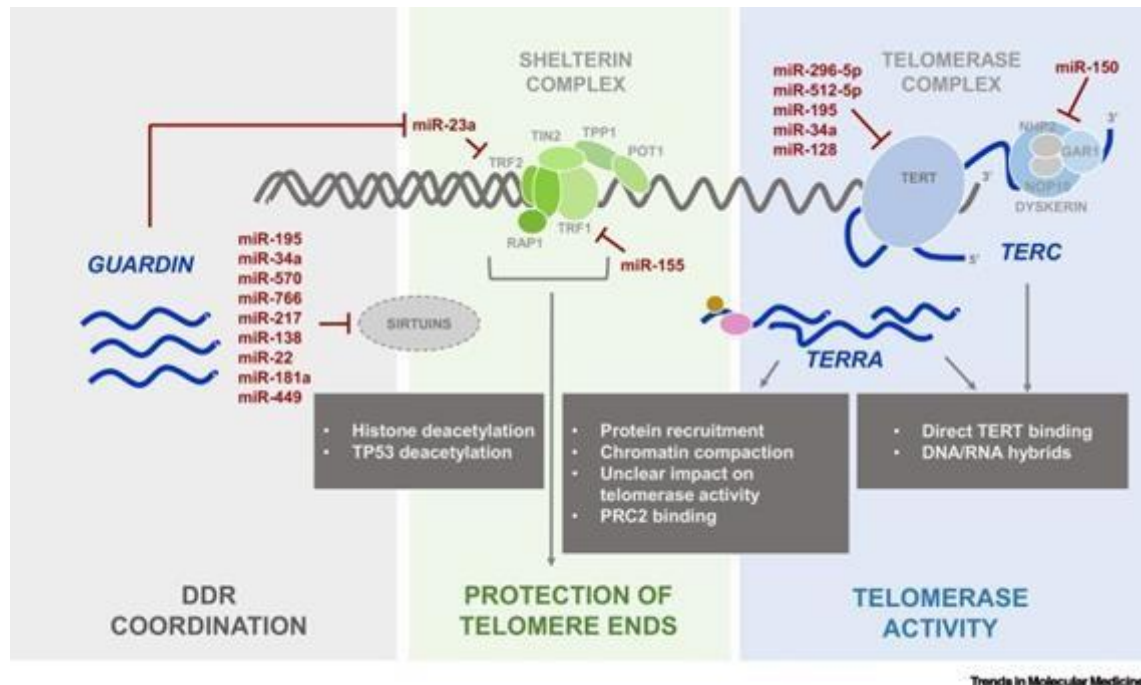


Figura 5: miARNs que regulan la actividad telomerasa. Tomado de: Rossi and Gorospe, Trends Mol Med. 2020 Apr;26(4):422-433.

El mismo grupo de investigadores también demostró que miR-155 presentaba niveles superiores a lo normal en las células de cáncer de mama. Se demostró que la expresión de miR-155 reduce la expresión de su objetivo directo TRF1 en los telómeros. TRF1 es una de las subunidades del complejo protector, también conocida como telosoma o shelterina, que es responsable de la protección del telómero [56].

La expresión elevada de miR-155 también resultó en fragilidad de los telómeros e inestabilidad genómica a través de la inhibición de TRF1, y este hecho está asociado con malos resultados clínicos y un pronóstico desfavorable en el cáncer de mama hormono-dependiente [56].

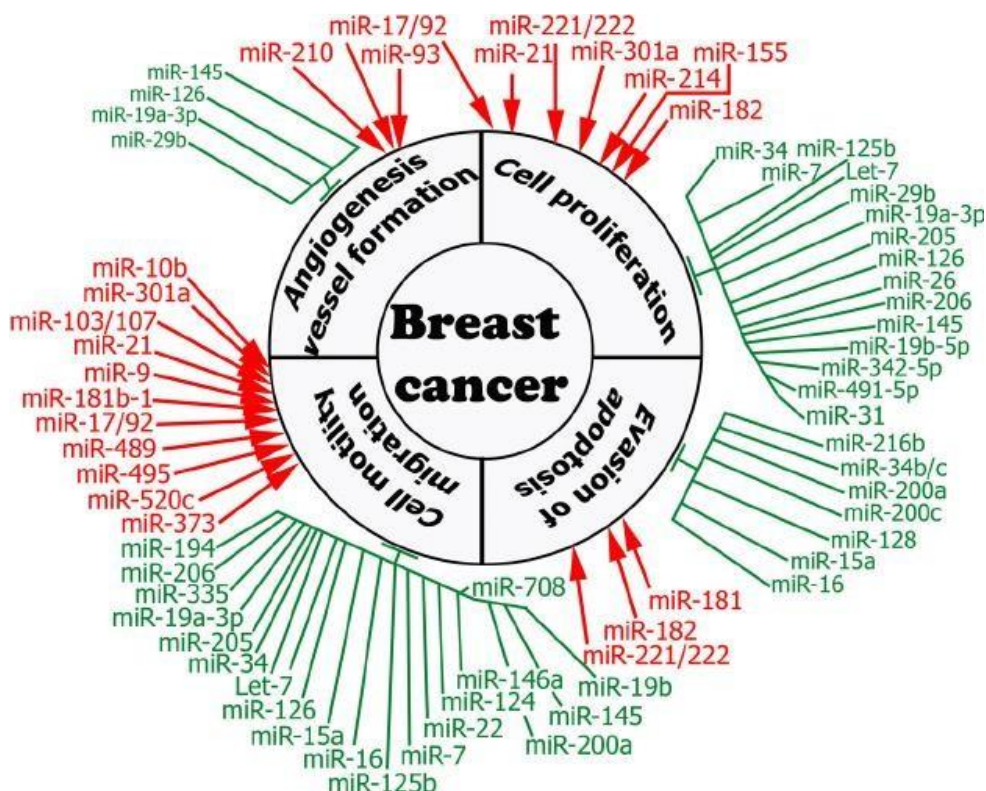


Figura 6: Compendio de microARNs implicados en los diversos procesos relacionados con el cáncer de mama. Tomado de: Fish y cols., Developmental Cell. **2008**, 272-284.

D. Hipoxia y angiogénesis:

A medida que se desarrolla un tumor, se expande rápidamente más allá de la vasculatura pre-existente y conduce a la formación de un microambiente tumoral de menor concentración de oxígeno en comparación con los tejidos sanos. Esta condición se conoce como hipoxia, que actúa como un regulador clave de angiogénesis en el cáncer de mama. Se cree que la proliferación y el crecimiento sostenidos del tumor de mama desencadenan la neoangiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para suministrar oxígeno y nutrientes al tumor. Al mismo tiempo, los capilares sanguíneos recién formados propagan el proceso metastásico al permitir la fácil penetración e infiltración de las células cancerosas [57].

El Factor Inducible por Hipoxia (HIF) pertenece a una familia de factores de transcripción que se producen en respuesta a la falta de oxígeno y que regulan varios procesos patológicos fundamentales en el cáncer de mama, incluida la homeostasis de las células madre, la metástasis, la proliferación celular en estos nuevos focos y la resistencia terapéutica. Además, el VEGF es otro factor proangiogénico importante que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos por parte de las células endoteliales [58].

Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos reguladores de estos genes relacionados con la hipoxia y la angiogénesis por parte de los microARNs podría ser la

base para el desarrollo de nuevos agentes antiangiogénicos prometedores con potencial para ser utilizados en el tratamiento del cáncer de mama.

El miR-210 es el miARN más constantemente y significativamente inducido durante la hipoxia. Se realizó un análisis mediante datos de secuenciación de miARNs en el curso temporal en células de cáncer de mama sometidas a hipoxia. La regulación al alza de miR-210-3p se detectó durante todo el tiempo del estudio. Además, se demostró que la regulación positiva de miR-210-3p está asociada a la presencia de los sitios de unión para el factor inducible por hipoxia (HIF) localizados en su región promotora, mediante el análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos contra HIF-1 α y HIF-2 α [59].

Recientemente se ha comercializado una molécula denominada Targapremir-210 que es un potente inhibidor del miR-210. Targapremir-210 presenta una gran afinidad de unión al sitio Dicer del precursor del miR-210. Esta interacción inhibe el procesamiento de miR-210 maduro lo que en células de cáncer de mama revirtió la represión de GPD1L, una proteína asociada a la hipoxia regulada negativamente por miR-210 y desencadenó la respuesta apoptótica en células TNBC en condiciones hipóxicas. Además, Targapremir-210 también inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjertos en ratones implantados con cáncer de TNBC hipóxico. En paralelo, se observó una expresión elevada de miR-210 en células de cáncer de mama cultivadas en condiciones hipóxicas. También se observó una disminución concomitante para Pax-5, una diana de miR-210 que es un importante regulador de la transición epitelio mesenquimal [59].

El objetivo directo de miR-191 (inducible por HIF bajo hipoxia) es la vía de señalización de TGF β cuya estimulación regula negativamente a la proteína de unión al ARNm, HuR. Se descubrió que los niveles de varios factores de transcripción y factores de crecimiento regulados por la ruta de TGF β , incluidos TGF β 2, SMAD3, BMP4, JUN, FOS, PTGS2, CTGF y VEGFA, eran más altos en las células de cáncer de mama que sobreexpresan miR-191. Finalmente, el tratamiento inhibidor de miR-191 condujo a una reducción drástica en el volumen del tumor esferoide [60].

Otro microARN sobreexpresado en células de cáncer de mama sometidas a condiciones de hipoxia es miR-24. La sobreexpresión de miR-24 en estas células condujo a una mayor formación de mamosferas, una mayor expresión de los genes relacionados con la desdiferenciación troncal Nanog y Oct-3/4 y una menor expresión del factor proapoptótico Bim-L. La supresión de F1H1, una asparaginil β -hidroxilasa que promueve la represión transcripcional de los HIF, mediada por miR-24, permitió la estabilización de la proteína HIF-1 α y aumentó los niveles de dos dianas directas de HIF-1 α : Snail y VEGFA. En contraste, la sobreexpresión de F1H1 revirtió estos efectos mediados por miR-24 [60].

Se descubrió que la sobreexpresión de miR-29b en células HUVEC (células endoteliales humanas obtenidas de cordón umbilical) reduce la tubulogénesis (formación de estructuras tubulares que semejan la organización de capilares), además de inhibir la proliferación, migración y capacidad de invasión de las células tumorales adyacentes. El tratamiento sistémico con miR-29b suprimió la vascularización tumoral, inhibió la

infiltración de macrófagos asociados a tumores, inhibió el crecimiento tumoral y promovió la respuesta apoptótica *in vivo*, sin inducir citotoxicidad. Finalmente, se demostró que el papel de miR-29b es como inhibidor de la angiogénesis y la tumorigénesis fue a través de la inactivación funcional de la proteína Akt3 y reduciendo la expresión de VEGF y c-MYC en las células de cáncer de mama [61].

Otro microARN con un importante papel inhibidor de la angiogénesis es miR-497. Tanto en líneas celulares derivadas de cáncer de mama como en muestras clínicas, se demostró que se produce una disminución de la expresión de miR-497. La sobreexpresión de este micro-ARN suprime la reorganización tubular (modelo de angiogénesis) en células HUVEC *in vitro*, y en un modelo de ratón desnudo *in vivo*, en ambos casos mediante la regulación de VEGF y HIF-1 α . La sobreexpresión de miR-497 interrumpió la formación de estructuras capilares *in vitro*, y condujo a una reducción de la densidad microvascular *in vivo*, [61].

El miR-140-5p está regulado negativamente en los estadios más avanzados del desarrollo tumoral, prácticamente desaparece en los tejidos con cáncer metastásico y está asociado con un peor pronóstico. La reintroducción de miR-140-5p en las células fue capaz de reducir la agresividad de los cánceres de mama y también redujo la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. El mecanismo sugerido por los autores es a través de la inhibición directa de VEGFA, junto con la disminución de la expresión de otras proteínas, incluidas CD31 (molécula de adhesión entre plaquetas y células endoteliales), Ki-67 (marcador de proliferación) y MMP-9 (metaloproteínasa de degradación de matriz extracelular). Con respecto al factor proangiogénico VEGFA, también hay evidencia de que miR-126 regula negativamente sus niveles [62].

Investigaciones recientes han demostrado que las células madre mesenquimales (MSC) pueden reclutarse quimiotácticamente atraídas por el microambiente tumoral y promover el desarrollo del tumor a través de su interacción con las células tumorales. Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que la regulación del estroma tumoral por parte de las MSC se produce a través de la secreción de vesículas extracelulares como los exosomas. Los exosomas derivados de las MSC tienen una función clave en la comunicación de célula a célula mediante la transferencia de sus componentes, que incluyen miARNs [62].

Sin embargo, también se han descrito mecanismos protectores contra el desarrollo tumoral a través de algunos microARNs. En este sentido, se ha descubierto que la transferencia de miR-100, que se encuentra altamente concentrado en exosomas derivados de MSC, fue responsable de una regulación negativa significativa en la expresión y secreción de VEGF a través de la modulación del eje de señalización mTOR/HIF-1 α en células de cáncer de mama. Además, los efectos inhibitorios de los exosomas derivados de MSC en la expresión de VEGF se eliminaron con la transfección con anti-miR-100, lo que resalta aún más el papel del traslado exosómico de miR-100 en el cáncer de mama. Finalmente, se demostró que la reducción del VEGF en respuesta a los exosomas derivados de las MSC reduce el comportamiento angiogénico de las células endoteliales *in vitro* al disminuir la proliferación y migración celular y la formación de tubos capilares. Por lo tanto, parece que miR-100 exosómico

puede servir como un supresor angiogénico potencial dentro del microambiente de las células de cáncer de mama. [62].

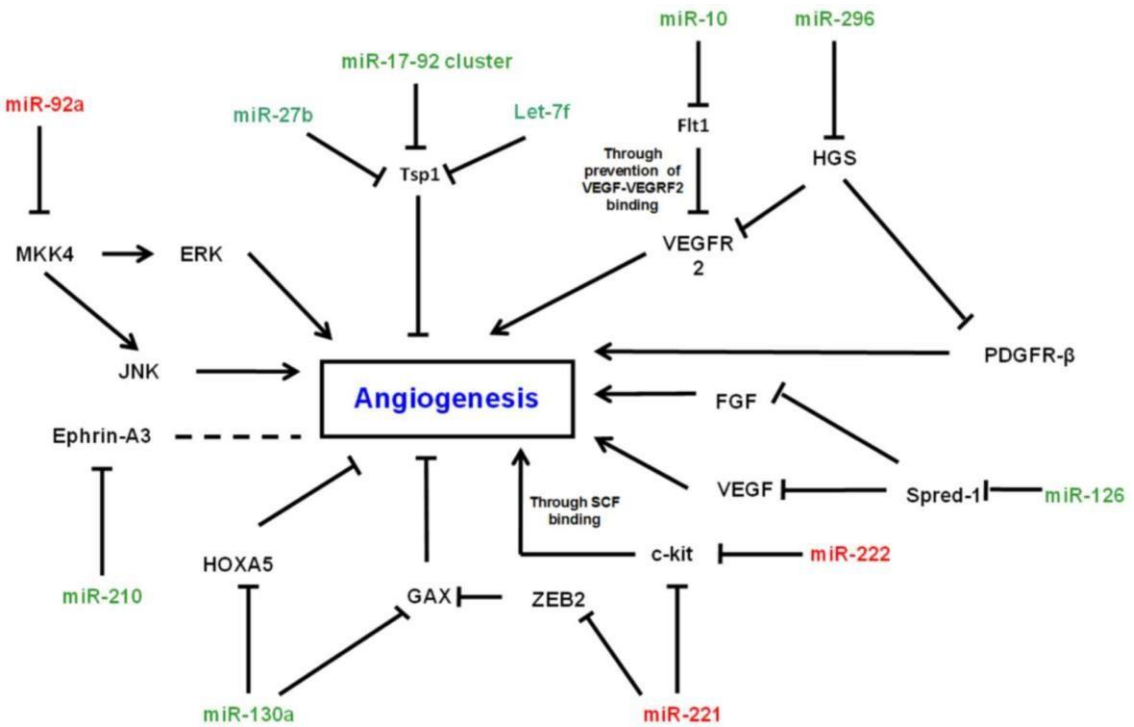


Figura 7: la he tomado de: Parham Jabbarzadeh Kaboli, Asmah Rahmat, Patimah Ismail, King-Hwa Ling. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. Pharmacological research. **2015**, 104-121.

A continuación, aparecerán dos [tablas (1a y 1b)] en las que se muestran los miARNs implicados en la regulación del cáncer de mama que se han ido mencionando a lo largo de este artículo. En la columna de la izquierda aparece el nombre del miARN, en la del medio los genes/ proteínas con los que interacciona/está relacionado éste y en la de la derecha los eventos asociados, es decir, el efecto desencadenado de esta interacción.

MicroRNA	Interacted/Correlated Gene(s) and Protein(s)	Associated Events
Major oncogenic microRNAs in breast cancer		
miR-1207-5p	STAT2, CDKN1A, CDKN1B	Promotion of cell proliferation and G2 cell cycle progression
miR-492	SOX7, cyclin D1, c-MYC	Promotion of cell proliferation and G1-S cell cycle progression
miR-135b	LATS2, CDK2, p-YAP	Promotion of cell proliferation and S-G2/M cell cycle progression
miR-200c and miR-141	SerpinB2, c-Jun, c-Fos, FosB, FOXP3, KAT2B	Promote metastasis and elevated in serum of metastatic mouse model and breast cancer patients
miR-331	HER2, HOTAIR, E2F1, DOHH, PHLPP	Promotion of metastasis and invasion by elevation in plasma of metastatic breast cancer patients
miR-200b	Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)	Promotion of metastasis and invasion
miR-122	pyruvate kinase (PK) and citrate synthase (CS)	Promotion of metastasis by reprogrammed glucose metabolism
miR-374a	E-cadherin, γ -catenin, CK18, vimentin, N-cadherin, B-catenin, WIF1, PTEN, WNT5A	Promotion of metastasis by regulating EMT and Wnt/ β -catenin signaling
miR-519a-3p	TRAIL-R2 (TNFRSF10B), caspase-8, caspase-7, MICA, ULBP2	Promotion of apoptosis resistance and escape from natural killer cell recognition
miR-191-5p	SOX4, caspase-3, caspase-7, p53	Promotion of apoptosis resistance and doxorubicin resistance
miR-21	Akt, BCL-2, BAX	Pro-survival effect can be overcome by kallistatin
miR-203	PKC-ERK, SOCS3	Pro-survival effect can be overcome by kallistatin
miR-155	TRF1	Telomere fragility and genomic instability
miR-210	HIFs, GPD1L, Pax-5	Hypoxia-inducible miRNA
miR-191	HuR, TGF β 2, SMAD3, BMP4, JUN, FOS, PTGS2, CTGF, VEGFA	Hypoxia-inducible miRNA and stimulator of TGF β -signaling pathways
miR-24	Nanog, Oct-3/4, BimL, F1H1, HIF-1 α , Snail, VEGFA	Hypoxia-inducible miRNA
Major tumor suppressor miRNAs in breast cancer		
miR-497	Cyclin E1 SMAD7 CD274	Anti-proliferative and G1-S cell cycle arrest Anti-metastasis and anti-invasion Anti-metastasis, anti-tumorigenic and inhibition of immune response or tumor immune escape
	VEGF, HIF-1 α	Anti-angiogenesis and anti-tumorigenic
miR-16	Cyclin E1, E2F7	Anti-proliferative and G1-S cell cycle arrest, restores tamoxifen sensitivity
miR-30c-2-3p	Cyclin E1	Anti-proliferative and G1-S cell cycle arrest
miR-483-3p	Cyclin E1, p-NPAT, CDK2	Anti-proliferative and G1-S cell cycle arrest
miR-143	ERK5, MAP3K7, Cyclin D1	Anti-proliferative
miR-455	CDK14, Cyclin D1, p21	Anti-proliferative
miR-424	CDK1, YAP, p-ERK1/2	Anti-proliferative and G2-M cell cycle arrest
miR-543	ERK/MAPK	Anti-proliferative, cell cycle arrest and apoptosis

Tabla 1a: miARNs implicados en la regulación del cáncer de mama. Esta tabla la he tomado de: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. International Journal of Molecular Sciences. **2019**, 1-20. [PubMed].

MicroRNA	Interacted/Correlated Gene(s) and Protein(s)	Associated Events
Major tumor suppressor miRNAs in breast cancer		
miR-26a	Cyclin D1, CDK4, CDK6, p21, p27, p53, RNF6/ER α /BCL-xL, E2F7, MYC, cyclin E2	Anti-proliferative, G1 cell cycle arrest and restores sensitivity to tamoxifen and trastuzumab treatment
miR-206	WBP2, p21, CDK4, cyclin D1	Anti-proliferative, cell cycle arrest and restores sensitivity to tamoxifen treatment
miR-15a	Cyclin E1, E2F7	Anti-proliferative and G1-S cell cycle arrest, restores tamoxifen sensitivity
miR-30b	Cyclin E2	Anti-proliferative, G1 cell cycle arrest and restores sensitivity to trastuzumab treatment
miR-365	GALNT4	Anti-proliferative and restores sensitivity to Fluorouracil chemotherapeutic treatment
miR-22	KRAS	Anti-proliferative and restores sensitivity to Paclitaxel chemotherapeutic treatment
miR-708	IKK β , COX-2, c-MYC	Anti-proliferative and regulates cell cycle arrest upon induction of glucocorticoid agonists, DEX and ATA
miR-124a and miR-26b	SerpinB2	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-195	FASN, HMGCR, ACACA, CYP27B1	Anti-metastasis and anti-invasion by underregulation in plasma of metastatic breast cancer patients
miR-148a	CD274	Anti-metastasis, anti-tumorigenic and inhibits immune response or tumor immune escape
	WNT-1, β -catenin, MMP-7, TCF-4	Anti-metastasis and anti-invasion by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway
	BCL-2, caspases	Promotes apoptotic response and overcomes chemoresistance
miR-340	c-MYC, CTNNB1, ROCK1	Anti-metastasis and anti-invasion by regulating Wnt/ β -catenin and Rho/Rho-associated kinase (ROCK) signaling pathways
miR-34a	TPD52, E-cadherin, TGF- β , N-cadherin	Anti-metastasis and anti-invasion by regulating EMT
miR-138	P53	Pro-apoptotic effect can be induced by kallistatin
miR-494	E-cadherin, vimentin, N-cadherin, Snail	Anti-metastasis and anti-invasion by regulating EMT
miR-494	PAK1, E-cadherin	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-33b	HMGA2, SALL4, Twist 1	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-421	MTA1	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-193a	WT1	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-211-5p	SETBP1	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-335	EphA4	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-133a	LASP1	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-124	STAT3	Anti-metastasis and anti-invasion
miR-204-5p	PIK3CB	Anti-metastasis, anti-tumorigenic, restores sensitivity towards PIK3CB inhibitors and chemotherapeutic drugs (i.e., doxorubicin, taxanes and bortezomib), and involved in tumor immune microenvironment remodeling
miR-204	JAK2, BCL-2, survivin	Promotion of apoptotic response
miR-101	EYA1, jagged1, Hes1, Hey1, SOX2	Promotion of apoptotic response by negatively regulating Notch pathway
miR-296-5p and miR-512-5p	hTERT	Reduction of telomerase activity, impairment of telomere maintenance and activation of replicative senescence and apoptosis programs
miR-29b	Akt3, VEGF, c-MYC	Anti-angiogenesis and anti-tumorigenesis
miR-140-5p	VEGFA, CD31, Ki-67, MMP-9	Anti-angiogenesis and anti-tumorigenesis
miR-126	VEGFA	Anti-angiogenesis and anti-tumorigenesis
miR-100	VEGF, mTOR/HIF-1 α	Shuttling of miRNA enriched in MSC-derived exosomes, anti-angiogenesis and anti-tumorigenesis

Tabla 1b: miARNs implicados en la regulación del cáncer de mama. Esta tabla la he tomado de: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. International Journal of Molecular Sciences. **2019**, 1-20. [PubMed].

En la siguiente imagen [figura 8] aparecerán los oncomiRs y tsmiRs que participan en la regulación postranscripcional de las funciones biológicas y las características distintivas o sellos distintivos del cáncer de mama. Los que aparecen macados con símbolos * ó ** indican los oncomiRs y tsmiRs que regulan más de un proceso.

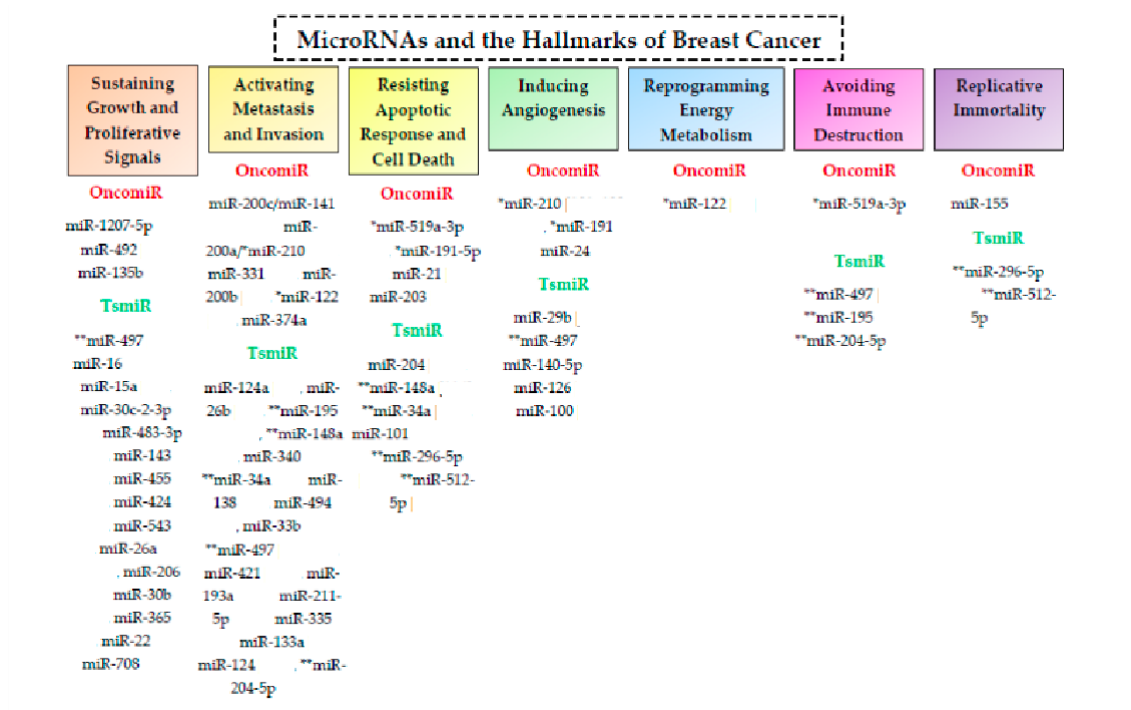


Figura 8: Esta imagen la he tomado de: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. International Journal of Molecular Sciences. **2019**, 1-20. [PubMed].

12. Los microARNs como marcadores para la detección precoz:

La enfermedad mamaria benigna, como la hiperplasia atípica (AH), se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama. Se ha propuesto que la tumorigénesis mamaria es un proceso de varios pasos que comienza lentamente con el desarrollo de células mamarias derivadas clonalmente, que conduce a AH, más adelante se convierte en carcinoma in situ (CIS), y finalmente en carcinoma invasivo.

Por lo tanto, la detección temprana del cáncer (en la etapa de hiperplasia AH), favorece las posibilidades de una completa resección quirúrgica, aumentando así la tasa de supervivencia del paciente. Sin embargo, en la actualidad, no hay biomarcadores que puedan diagnosticar con precisión AH.

Se examinó si los miARN presentes en el suero podrían servir como biomarcadores para discriminar entre pacientes con AH o pacientes con cáncer de mama en etapa temprana en comparación con pacientes sanas o con tumores proliferativos benignos. El primer estudio realizado no fue muy esperanzador. Del conjunto de miARNs analizados, solo miR-24 y miR-103a mostraron una baja regulación significativa en AH y cáncer de mama en estadio temprano. Las diferencias en los niveles de estos

microARNs en el suero de pacientes con tumor proliferativo benigno en comparación con personas sanas ya eran muy pequeñas. Sin embargo, no hubo una relación significativa entre estos miARNs y TNM (clasificación de tumores malignos), estadificación o clínica molecular, aunque su regulación se redujo lentamente con la progresión del cáncer de mama (carcinoma ductal in situ(DCIS), I, II). Sin embargo, esta investigación estuvo limitada por un tamaño de muestra pequeño y la falta de una exploración detallada de los mecanismos que subyacen tras la participación de estos miARNs en la progresión del cáncer de mama [63].

Otro grupo de investigación llevó a cabo un estudio de análisis de expresión global basado en microarrays de miARN en una serie de líneas celulares representativas de diferentes etapas del cáncer de mama. Este análisis permitió identificar solamente un microARN, el miR-205-5p que estaba marcadamente disminuido en las líneas celulares metastásicas e invasivas (21MT-1 y 21MT-2) en relación con las células no proliferativas localizadas (21PT y 21NT). La expresión reducida de miR-205-5p también se asoció con un grado de tumor histopatológico avanzado y mayores tasas de invasión en un ensayo migratorio de células. La transfección de células metastásicas (células 21MT1 y 21MT2) con el precursor miR-205-5p resultó en un potencial migratorio reducido, mientras que las células sanas o representativas de carcinoma in situ (células H16N2, 21PT y 21NT) se transfectadas con el inhibidor de miR-205-5p mostraron elevación parcial en la tasa de migración. Por lo tanto, este trabajo mostró que miR-205-3p puede servir como un biomarcador clave con diferentes niveles durante la progresión tumoral [63].

En resumen, los resultados descritos anteriormente sugieren que la pérdida de regulación de la expresión de miARNs parece desempeñar un papel fundamental en la transición desde situaciones celulares no proliferativas a un estado canceroso. La mayoría de las investigaciones publicadas sobre miARNs en el contexto del cáncer de mama solo consideran el cáncer de mama establecido en etapa tardía. Dado el potencial de los miARN como biomarcadores sensibles para el cáncer en etapa temprana, como la enfermedad benigna de mama, en el cual el pronóstico de la enfermedad es considerablemente más favorable, parece claro que se necesita más investigación para investigar el impacto regulador de estas moléculas específicamente en el cáncer de mama en estadio temprano.

13. Potencial terapéutico de miARNs en el cáncer de mama:

Debido a su pequeño tamaño molecular y su capacidad para regular la expresión de genes asociados con la progresión de varios tipos de cáncer, los miARN tienen el potencial de revolucionar la terapéutica del cáncer de mama. Las posibles terapias contra el cáncer de mama basadas en miARN generalmente se basan en los enfoques de silenciar miARN oncogénicos mediante inhibidores de miARN o restaurar las funciones de los miARN supresores de tumores mediante moléculas sintéticas que mimeticen su función. Los estudios experimentales de la potencial utilidad terapéutica de los enfoques centrados en miARN han empleado, hasta la fecha, técnicas in vitro en general para cuantificar sus efectos sobre las concentraciones de ARNm y proteínas.

Las estrategias terapéuticas que se diseñen con idea de modificar los niveles de los miARNs se pueden utilizar para restaurar la expresión y función normales de los genes supresores de tumores diana mediante la inhibición de los miARN oncogénicos (que normalmente están sobreexpresados en los cánceres de mama humanos). Los antagonistas de miARN o los antagomirs son oligonucleótidos complementarios monocatenarios y químicamente modificados que pueden inhibir de manera competitiva el reconocimiento y procesamiento de los miARN oncogénicos endógenos por parte de RISC. Esto hace que los miARN inhibidos ya no puedan reconocer o interactuar con sus dianas: los Arna supresores de tumores. Antagomirs tales como oligonucleótidos modificados con 2'-O-metilo, anti-miRs de ácido nucleico bloqueado (LNA) y antagomirs conjugados con colesterol se encuentran entre los inhibidores de miARN que se están empezando a usar ampliamente en la terapia de inhibición de miARN [64].

Además, también ha habido interés en el potencial terapéutico de las denominadas “esponjas de microARNs” que contienen múltiples sitios de unión de miARN artificiales que pueden unirse e inhibir competitivamente miARN específicos o grupos de miARN [65]. Por el contrario, las denominadas “máscaras de miARNs” pueden unirse al ARNm objetivo e inhibir selectivamente la interacción con el miARN específico [66]. Estos ácidos nucleicos de enmascaramiento pueden ocultar con precisión el ARNm del miARN endógeno y así prevenir su supresión.

En la terapia de reemplazo de miARN, la función normal de los miARN supresores de tumores puede restablecerse reemplazando o sustituyendo los miARN regulados negativamente empleando moléculas sintéticas similares a miARN conocidas como imitadores de miARN. Estos imitadores de miARN son pequeños dúplex de 2'-O'-metoxi ARN químicamente modificados que pueden incorporarse a RISC, imitando la función de miARN endógenos inhibiendo los ARNm diana que son comúnmente oncogénicos [67].

En general, los moduladores de miARN tienen baja estabilidad; los ARN desnudos tienden a ser degradados por nucleasas y eliminados del cuerpo por excreción renal. Por lo tanto, la llegada específica, eficiente y segura de moduladores de miARN a los sitios del tumor es crucial para el éxito de las estrategias terapéuticas contra el cáncer basadas en miARN. La entrega efectiva de miARN se ha conseguido empleando varios vectores virales, tales como lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV), que expresan antagonistas o imitadores de miARN [68].

Por otro lado, los portadores de lípidos nano estructurados, como los liposomas que consisten en bicapas lipídicas, también se han empleado con éxito; estos encapsulan los antagonistas o imitadores de miARN, protegiéndolos de la degradación de nucleasas y aumentando la estabilidad de su suministro a las células. Las nano partículas como derivados del poli etilenglicol (PEG), las nano partículas inorgánicas (hierro, oro, carbono, sílice) y las nano partículas con moléculas de direccionamiento como ligando, péptidos o anticuerpos también se pueden usar para la entrega efectiva de miARNs. Además, los métodos basados en polímeros también tienen potencial debido a su biodegradabilidad y alta afinidad electrostática por las membranas celulares. La administración de miARN también se ha logrado utilizando polietilenimina sintética

(PEI), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y otros polímeros catiónicos naturales como el quitosano y el atelocolágeno [69].

La tecnología de CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas) -Cas 9 (proteína 9 asociada a CRISPR) es un enfoque de edición del genoma recientemente emergente que ha recibido una atención generalizada como una técnica para la eliminación total y permanente de genes [70]. CRISPR-Cas 9 se ha utilizado para editar genes que codifican proteínas en el cáncer de mama, incluidos HER2 y MIEN1 [71].

Sin embargo, la edición de genes de ARN que no codifican proteínas (incluidos los miARN) utilizando este enfoque ha recibido relativamente poca atención hasta el momento. La mayoría de las estrategias de reemplazo de miARN publicadas actualmente se han basado en la transfección transitoria de inhibidores de miARN o antagonistas en las células], promoviendo solo su expresión durante un período de tiempo finito sin integración en el genoma celular. Además, se ha sugerido que el material transfectado es probable que sea degradado por nucleasas o diluido después de la división celular [72].

Sin embargo, en un estudio reciente, se ha utilizado la tecnología CRISPR-Cas9 para la eliminación de miR-23b y miR-27b para estudiar su regulación en las células de cáncer de mama [73]. La pérdida genómica de miR-23b / 27b dio como resultado una tasa de proliferación celular reducida, la formación de menos colonias celulares y la atenuación del crecimiento independiente del anclaje in vitro. Además, la tasa de crecimiento y el volumen tumoral de los xenoinjertos de ratones knockout miR-23b/27b se redujo drásticamente en comparación con los ratones control tratados con vectores vacíos. Por lo tanto, estos datos sugieren que la edición de genes que codifican miRNA endógenos es un enfoque terapéutico potencialmente revolucionario para el cáncer de mama.

14. Conclusiones:

Existe una extensa y creciente literatura que apoya firmemente la participación de miARNs en cánceres como el de mama. Cada vez se reconoce más que estas moléculas juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica para lograr la homeostasis, y que la desregulación de su actividad puede tener consecuencias adversas en una amplia gama de vías de la enfermedad.

Por lo tanto, existe un gran potencial para que la terapéutica basada en miARN sirva como enfoques altamente específicos o terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de mama. Este potencial se evidencia en estudios in vitro, que muestran que las técnicas basadas en miARN pueden modular la expresión de genes diana de una manera altamente específica y efectiva.

Sin embargo, hay varios desafíos que superar para traducir con éxito estos resultados de laboratorio prometedores en terapias eficaces en la práctica clínica. Estos factores incluyen el desarrollo de opciones de administración más eficientes o el problema de la degradación, los posibles efectos fuera del objetivo y la seguridad a largo plazo de estos agentes in vivo.

Además, los mecanismos subyacentes que gobiernan las redes de interacción entre los miARNs y el genoma humano, el transcriptoma y el proteoma deben entenderse claramente antes de su transición efectiva a entornos médicos o farmacéuticos. Por lo tanto, es importante que las consecuencias más amplias de las terapias candidatas basadas en miARN se estudien in vivo dentro de un sistema biológico complejo, utilizando enfoques multiméricos. Además, entre los miARNs desregulados específicamente en el cáncer de mama, es importante determinar el miARN o los grupos de miARN más representativos en cada etapa de la enfermedad; esto ayudará a identificar y priorizar los objetivos de tratamiento más prometedores, con énfasis en desarrollar estrategias para la detección y tratamiento precoz del cáncer de mama.

En conclusión, el avance terapéutico basado en miARNs tiene el potencial de revolucionar y personalizar el tratamiento del cáncer de mama. Primero se requiere un conocimiento más profundo de los mecanismos de acción y las consecuencias biológicas más amplias de las terapias basadas en miARNs, pero estas no deben considerarse barreras insalvables para combatir esta enfermedad común y devastadora.

15. Agradecimientos:

No sería de recibo concluir este trabajo sin antes agradecer, de corazón, la labor que han realizado todas esas personas que me han permitido llevarlo a cabo.

En primer lugar, a mi tutor Carlos Manuel Martínez Campa, quien ha estado respaldando este proyecto en todo momento, me ha guiado en cada paso que he ido dando para sacar este trabajo de fin de grado adelante. Aunque nuestra comunicación haya tenido que ser vía telemática, debido a la pandemia mundial originada por el SARS-CoV-2 que desgraciadamente está azotando a nuestro país, he podido contar con su ayuda en todo momento. Ha sido un placer haberle tenido como tutor.

Para continuar, me gustaría mencionar también todo el apoyo que he recibido por parte de mi familia, desde el día que tomé la decisión de convertirme en médica han estado ahí para darme las fuerzas que en algún momento me han faltado y para recordarme, que sería capaz de lograr el objetivo de terminar la carrera de medicina, así como, cualquier otro que me plantease en esta vida.

Por último, pero no por ello menos importante, me gustaría mencionar el apoyo para seguir adelante, mantener mi mente fuerte y mi concentración (que en tiempos de confinamiento no es nada fácil) que me han transmitido mis amigos y en especial, mis compañeras de piso, que me han acompañado en muchas de las horas que le he dedicado a esta publicación.

16. Bibliografia:

1. Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 1-20. [PubMed].
2. Bhardwaj, A.; Singh, S.; Singh, A.P. MicroRNA-based cancer therapeutics: Big hope from small RNAs. *Mol. Cell Pharmacol*. **2010**, 2, 213–219. [PubMed].
3. Polyak, K. Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Investig*. **2011**, 121, 3786–3788. [CrossRef].
4. Van Schooneveld, E.; Wouters, M.C.; Van der Auwera, I.; Peeters, D.J.; Wildiers, H.; Van Dam, P.A.; Van Laere, S.J. Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res*. **2012**, 14, R34. [CrossRef].
5. Lukong KE (**2017**) Understanding breast cancer, the long and winding road. *BBA Clin* 7:64–77.
6. Saha Roy S, Vadlamudi RK (**2011**) Role of estrogen receptor signaling in breast Cancer metastasis. *Int J Breast Cancer* 2012:1–8.
7. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minu F (**2014**) Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90:13–29.
8. Ali S, Rasool M, Chaoudhay H, Pushparaj PN, Jha P, Hafiz A, Mahfooz M, Sami GA, Kamal MA, Bashir S, Ali A, Jamal MS (**2016**) Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* 12(3):135–139.
9. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI (**2004**) Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* 90:2–6.
10. Saha Roy S, Vadlamudi RK (**2011**) Role of estrogen receptor signaling in breast Cancer metastasis. *Int J Breast Cancer* 2012:1–8.
11. Gérard Maillot; Magali Lacroix-Triki; Sandra Pierredon; Lise Gratadou; Sabine Schmidt; Vladimir Bénès; Henri Roché; Florence Dalenc; Didier Auboeuf; Stefania Millevoi; Stéphan Vagner. Widespread Estrogen-Dependent Repression of microRNAs Involved in Breast Tumor Cell Growth. *The journal of Cancer Research*. **2009**; 69:8332-8340.
12. Yamashita H. Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol* **2008**;13: 380-3.
13. Speirs V, Walker RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol* **2007**; 211:499–506.
14. Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, Chegini N. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod* **2007**;13: 797–806.
15. Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol* **2007**; 21:1132–47.
16. Ochsner SA, Steffen DL, Hilsenbeck SG, Chen ES, Watkins C, McKenna NJ. GEMS (Gene Expression Meta-Signatures), a Web resource for querying meta-

- analysis of expression microarray datasets: 17 β -estradiol in MCF-7 cells. *Cancer Res* **2009**; 69:23–6.
17. Ochsner SA, Steffen DL, Hilsenbeck SG, Chen ES, Watkins C, McKenna NJ. GEMS (Gene Expression Meta- Signatures), a Web resource for querying meta-analysis of expression microarray datasets: 17 β -estradiol in MCF-7 cells. *Cancer Res* **2009**; 69:23–6.
 18. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **2005**; 435:839–43.
 19. Carroll JS, Meyer CA, Song J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* **2006**; 38:1289–97.
 20. Lange CA. Challenges to defining a role for progester- one in breast cancer. *Steroids* **2008**; 73:914–21.
 21. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **2007**; 129:1401–14.
 22. Pandey DP, Picard D. miR-22 inhibits estrogen sig- naling by directly targeting the estrogen receptor α mRNA. *Mol Cell Biol* **2009**.
 23. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* **2008**; 320:1643–7.
 24. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, et al. MicroRNA- 221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* **2008**;283: 29897–903.
 25. Melo, S.A.; Esteller, M. Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Lett.* **2011**, 585, 2087–2099. [CrossRef] [PubMed].
 26. Iorio, M.V.; Ferracin, M.; Liu, C.-G.; Veronese, A.; Spizzo, R.; Sabbioni, S.; Croce, C.M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* **2005**, 65, 7065–7070. [CrossRef].
 27. Wang, W.; Luo, Y.P. MicroRNAs in breast cancer: Oncogene and tumor suppressors with clinical potential. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2015**, 16, 18–31. [CrossRef].
 28. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674. [CrossRef].
 29. Chu, J.; Zhu, Y.; Liu, Y.; Sun, L.; Lv, X.; Wu, Y.; Liu, Q. E2F7 overexpression leads to tamoxifen resistance in breast cancer cells by competing with E2F1 at miR-15a/16 promoter. *Oncotarget* **2015**, 6, 31944–31957. [CrossRef].
 30. Song, Y.K.; Wang, Y.; Wen, Y.Y.; Zhao, P.; Bian, Z.J. MicroRNA-22 suppresses breast cancer cell growth and increases paclitaxel sensitivity by targeting NRAS. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2018**, 17. [CrossRef].
 31. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 June ;133(3):937-47.
 32. Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, 18, 43–73. [CrossRef].
 33. Jeanes, A.; Gottardi, C.J.; Yap, A.S. Cadherins and cancer: How does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **2008**, 27, 6920–6929. [CrossRef].
 34. Tian, X.; Liu, Z.; Niu, B.; Zhang, J.; Tan, T.K.; Lee, S.R.; Zheng, G. E-Cadherin/ β -Catenin complex and the epithelial barrier. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 2011, 1–6. [CrossRef].

35. Jin, T.; Suk Kim, H.; Ki Choi, S.; Hye Hwang, E.; Woo, J.; Suk Ryu, H.; Kyung Moon, W. MicroRNA-200c/141 upregulates SerpinB2 to promote breast cancer cell metastasis and reduce patient survival. *Oncotarget* **2017**, *8*, 32769–32782. [CrossRef].
36. Zhang, G.; Zhang, W.; Li, B.; Stringer-Reasor, E.; Chu, C.; Sun, L.; Wang, L. MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT2B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2017**, *19*, 73. [CrossRef].
37. McAnena, P.; Tanriverdi, K.; Curran, C.; Gilligan, K.; Freedman, J.E.; Brown, J.; Kerin, M.J. Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal a from metastatic breast cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 436. [CrossRef].
38. Hong, H.; Yu, H.; Yuan, J.; Guo, C.; Cao, H.; Li, W.; Xiao, C. MicroRNA-200b impacts breast cancer cell migration and invasion by regulating Ezrin-Radixin-Moesin. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2016**, *22*, 1946–1952. [CrossRef].
39. Fong, M.Y.; Zhou, W.; Liu, L.; Alontaga, A.Y.; Chandra, M.; Ashby, J.; Wang, S.E. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 183–194. [CrossRef].
40. Cai, J.; Guan, H.; Fang, L.; Yang, Y.; Zhu, X.; Yuan, J.; Li, M. MicroRNA-374a activates Wnt/ β -catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 566–579. [CrossRef].
41. Jiang, Q.; He, M.; Ma, M.T.; Wu, H.Z.; Yu, Z.J.; Guan, S.; Wei, M.J. MicroRNA-148a inhibits breast cancer migration and invasion by directly targeting WNT-1. *Oncol. Rep.* **2015**, *35*, 1425–1432. [CrossRef] [PubMed].
42. Mohammadi-Yeganeh, S.; Paryan, M.; Arefian, E.; Vasei, M.; Ghanbarian, H.; Mahdian, R.; Soleimani, M. MicroRNA-340 inhibits the migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells by targeting Wnt pathway. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 8993–9000. [CrossRef] [PubMed].
43. Li, G.; Yao, L.; Zhang, J.; Li, X.; Dang, S.; Zeng, K.; Gao, F. Tumor-suppressive microRNA-34a inhibits breast cancer cell migration and invasion via targeting oncogenic TPD52. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 7481–7491. [CrossRef] [PubMed].
44. Zhang, J.; Liu, D.; Feng, Z.; Mao, J.; Zhang, C.; Lu, Y.; Li, L. MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *77*, 135–141. [CrossRef] [PubMed].
45. Zhan, M.N.; Yu, X.T.; Tang, J.; Zhou, C.X.; Wang, C.L.; Yin, Q.Q.; Zhao, Q. MicroRNA-494 inhibits breast cancer progression by directly targeting PAK1. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2529. [CrossRef].
46. Lin, Y.; Liu, A.Y.; Fan, C.; Zheng, H.; Li, Y.; Zhang, C.; Ouyang, G. MicroRNA-33b inhibits breast cancer metastasis by targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9995. [CrossRef].
47. Liu, J.; Zhou, Y.; Shi, Z.; Hu, Y.; Meng, T.; Zhang, X.; Zhang, J. MicroRNA-497 modulates breast cancer cell proliferation, invasion, and survival by targeting SMAD7. *DNA Cell Biol.* **2016**, *35*, 521–529. [CrossRef].
48. Yang, L.; Cai, Y.; Zhang, D.; Sun, J.; Xu, C.; Zhao, W.; Pan, C. MiR-195/miR-497 regulated CD274 expression of immune regulatory ligands in triple-negative breast cancer. *J. Breast Cancer* **2018**, *21*, 371–381. [CrossRef] [PubMed].

49. Manson, Q.F.; Schrijver, W.; TerHoeve, N.D.; Moelans, C.B.; vanDiest, P.J. Frequent discordance in PD-1 and PD-L1 expression between primary breast tumors and their matched distant metastases. *Clin. Exp. Metastasis* **2019**, *36*, 29–37. [CrossRef] [PubMed].
50. Hong, B.S.; Ryu, H.S.; Kim, N.; Kim, J.; Lee, E.; Moon, H.; Moon, H.G. Tumor suppressor microRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1520–1534. [CrossRef] [PubMed].
51. Li, Q.; Ren, P.; Shi, P.; Chen, Y.; Xiang, F.; Zhang, L.; Xie, M. MicroRNA-148a promotes apoptosis and suppresses growth of breast cancer cells by targeting B-cell lymphoma 2. *Anti-Cancer Drugs* **2017**, *28*, 588–595. [CrossRef] [PubMed].
52. Li, P.; Guo, Y.; Bledsoe, G.; Yang, Z.; Chao, L.; Chao, J. Kallistatin induces breast cancer cell apoptosis and autophagy by modulating Wnt signaling and microRNA synthesis. *Exp. Cell Res.* **2016**, *340*, 305–314. [CrossRef].
53. Muraki, K.; Nyhan, K.; Han, L.; Murnane, J.P. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 135. [CrossRef].
54. Ludlow, A.T.; Slusher, A.L.; Sayed, M.E. Insights into Telomerase/hTERT alternatives splicing regulation using bioinformatics and network analysis in cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 666. [CrossRef].
55. Dinami, R.; Buemi, V.; Sestito, R.; Zappone, A.; Ciani, Y.; Mano, M.; Schoeftner, S. Epigenetic silencing of miR-296 and miR-512 ensures hTERT dependent apoptosis protection and telomere maintenance in basal-type breast cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 95674–95691. [CrossRef] [PubMed].
56. Dinami, R.; Ercolani, C.; Petti, E.; Piazza, S.; Ciani, Y.; Sestito, R.; Schoeftner, S. MiR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4145–4156. [CrossRef] [PubMed].
57. Langley, R.R.; Fidler, I.J. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr. Rev.* **2007**, *28*, 297–321. [CrossRef].
58. Camps, C.; Saini, H.K.; Mole, D.R.; Choudhry, H.; Reczko, M.; Guerra Assunção, J.A.; Ragoussis, J. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 28. [CrossRef].
59. Costales, M.G.; Haga, C.L.; Velagapudi, S.P.; Childs Disney, J.L.; Phinney, D.G.; Disney, M.D. Small molecule inhibition of microRNA-210 reprograms an oncogenic hypoxic circuit. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3446–3455. [CrossRef] [PubMed].
60. Nagpal, N.; Ahmad, H.M.; Chameettachal, S.; Sundar, D.; Ghosh, S.; Kulshreshtha, R. HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF β -signaling in hypoxic microenvironment. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9650. [CrossRef] [PubMed].
61. Trivanovic, D.; Krstic, J.; Djordjevic, I.O.; Mojsilovic, S.; Santibanez, J.F.; Bugarski, D.; Jakukovic, A. The roles of mesenchymal stromal/stem cells in tumor microenvironment associated with inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 7314016. [CrossRef].
62. Zhou, J.; Tan, X.; Tan, Y.; Li, Q.; Ma, J.; Wang, G. Mesenchymal stem cell derived exosomes in cancer progression, metastasis and drug delivery: A comprehensive review. *J. Cancer* **2018**, *9*, 3129–3137. [CrossRef].

63. Kader, T.; Hill, P.; Rakha, E.A.; Campbell, I.G.; Gorringer, K.L. Atypical ductal hyperplasia: Update on diagnosis, management, and molecular landscape. *Breast Cancer Res.* **2018**, *20*, 39. [CrossRef] [PubMed]
64. NikZainal,S.;VanLoo,P.;Wedge,D.C.;Alexandrov,L.B.;Greenman,C.D.;Lau,K.W.;Breastcancerworking group of the international cancer genome consortium. The life history of 21 breast cancers. *Cell* **2012**, *149*, 994–1007. [CrossRef].
65. Stankevicius,L.;Barat,A.;Dessen,P.;Vassetzky,Y.;deMouraGallo,C.V.The microRNA A-205-5p is correlated to metastatic potential of 21T series: A breast cancer progression model. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173756. [CrossRef].
66. Murakami, K.; Miyagishi, M. Tiny masking locked nucleic acids effectively bind to mRNA and inhibit binding of microRNAs in relation to thermodynamic stability. *Biomed. Rep.* **2014**, *2*, 509–512. [CrossRef].
67. Van Treuren, T.; Vishwanatha, J.K. CRISPR deletion of MIEN1 in breast cancer cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204976. [CrossRef] [PubMed].
68. Herrera-Carrillo, E.; Liu, Y.P.; Berkhout, B. Improving miRNA delivery by optimizing mirna expression cassettes in diverse virus vectors. *Hum. Gene Ther. Methods* **2017**, *28*, 177–190. [CrossRef].
69. Lam, J.K.; Chow, M.Y.; Zhang, Y.; Leung, S.W. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* **2015**, *4*, 252. [CrossRef] [PubMed].
70. Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1911. [CrossRef] [PubMed].
71. Wang, H.; Sun, W. CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation. *Cancer Lett.* **2017**, *385*, 137–143. [CrossRef] [PubMed].
72. Kim, T.K.; Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3173–3178. [CrossRef].
73. Hannafon,B.N.;Cai,A.;Calloway,C.L.;Xu,Y.F.;Zhang,R.;Fung,K.M.;Ding,W.Q.MiR-23b and miR-27b are oncogenic microRNAs in breast cancer: Evidence from a CRISPR/Cas9 deletion study. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 642. [CrossRef].

Figura 1: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* **2019**, 1-20. [PubMed].

Figura 2: Deepika Sharma; Sanjiv Kumar; Balasubramanian Narasimhan. Estrogen alpha receptor antagonist for treatment of breast cancer: a review. *Chemistry central journal.* **2018**, 12-107.

Figura 3: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* **2019**, 1-20. [PubMed].

Figura 4: Bouyssou y cols, *Biochimica et biophysica acta (BBA)*-Reviews on cancer. **2014**, 255-265.

Figura 5: Rossi and Gorospe, *Trends Mol Med*. **2020** April;26(4):422-433.

Figura 6: Jason E.Fish, Massimo M.Santoro, Sarah U.Morton, Sangho Yu, Ru-Fang Yeh, Joshua D. Wythe, Kathryn N. Ivery, Benoit G. Bruneau, Didier Y.R. Stainier, Deepak Srivastava. miR-126 Regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell*. **2008**, 272-284.

Figura 7: Parham Jabbarzadeh Kaboli, Asmah Rahmat, Patimah Ismail, King-Hwa Ling. MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacological research*. **2015**, 104-121.

Figura 8: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 1-20. [PubMed].

Tablas 1 a y 1 b: Hui-Yi Loh; Brendan P. Norman; Kok-Song Lai; Nik Mohd Afizan Nik Abd. Rahman; Noorjahan Banu Mohamed Alitheen; Mohd Azuraiddi Osman. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 1-20. [PubMed].